

**Entwicklung und Anwendung
eines enzymimmunologischen Nachweisverfahrens
für Diacetoxyscirpenol**

Ulrich Klaffer

Disbui. München

1988



Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Nachweisverfahrens für Diacetoxyscirpenol

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ulrich Klaffer
aus
Regensburg

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Prof. Dr. M. Merkenschlager

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

Meiner Familie

und

Nr. 9

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung	1
2	Schrifttum	2
2.1	Geschichte	2
2.2	Chemische Eigenschaften	3
2.3	DAS bildende Schimmelpilze	7
2.4	Natürliches Vorkommen von DAS	9
2.5	Biochemische Wirkungen des DAS	10
2.6	Toxische Wirkungen des DAS	13
2.7	Wirkungen auf das Immunsystem	16
2.8	Metabolismus	18
2.9	Nachweisverfahren	19
2.9.1	Physikalisch-chemische Verfahren	19
2.9.1.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	20
2.9.1.2	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	20
2.9.1.3	Gas-Flüssig-Chromatographie (GLC)	21
2.9.1.4	Gas-Chromatographie-Massenspektroskopie (GS-MS)	22
2.9.2	Biologische Verfahren	25
2.9.3	Immunologische Verfahren	25
2.9.3.1	Antikörpergewinnung	27
2.9.3.2	RIA	27
2.9.3.3	ELISA	29
2.9.3.4	Enzymimmunologischer Nachweis von Trichothecenen	35
3	Eigene Untersuchungen	38
3.1	Herstellung des DAS-Enzymkonjugates	38
3.1.1	Material	38
3.1.2	Methodik	39
3.1.2.1	Umwandlung von DAS zu DAS-Hemisuccinat (DAS-HS)	39
3.1.2.2	Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Umsetzung	39
3.1.2.3	Kopplung von HRP an DAS-HS	40
3.1.2.4	Reinigung des Kopplungsproduktes	40
3.1.2.5	Ergebnisse	42
3.2	Herstellung eines immunogen wirksamen DAS-Konjugates	42
3.2.1	Material	42

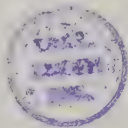
3.2.2	Methodik	44
3.2.2.1	Herstellung eines zur Kopplung befähigten DAS-HG	44
3.2.2.2	Kopplung von DAS-HG an Human Serumalbumin (HSA)	44
3.2.2.3	Kopplung von DAS-HS an HSA	44
3.2.2.4	Ergebnisse	46
3.3	Immunisierungsversuche	46
3.3.1	Material	46
3.3.2	Methodik	47
3.3.2.1	Immunisierung von Kaninchen	47
3.3.2.2	Serenaufbereitung	48
3.3.2.3	Nachweis spezifischer Antikörper mittels ELISA	49
3.3.2.4	Ergebnisse	50
3.4	Entwicklung eines simultanen kompetitiven ELISA zum Nachweis von DAS	53
3.4.1	Material	53
3.4.2	Methodik	55
3.4.2.1	Versuche zur Abstimmung der Reaktionspartner	55
3.4.2.1.1	Auswahl des spezifischsten Antiserums	55
3.4.2.1.2	Ermittlung der geeigneten Antiserum- und Enzymkonjugatverdünnung	57
3.4.3	Ergebnisse	58
3.4.4	Standardisierung	61
3.4.4.1	Methodik	61
3.4.4.2	Ergebnisse	64
3.4.5	Kreuzreaktionen des Antiserums mit anderen Trichothecen	64
3.4.5.1	Methodik	64
3.4.5.2	Ergebnisse	66
3.5	Erstellung eines konsekutiven simultanen ELISA zum Nachweis von DAS	66
3.5.1	Methodik	66
3.5.2	Ergebnisse	68
3.6	Entwicklung eines ELISA mittels Double Antibody- Solid-Phase (DASP)-Technik	71
3.6.1	Methodik	71
3.6.2	Ergebnisse	71
3.7	Nachweis von DAS in Lebens- und Futtermitteln	73
3.7.1	Material	73

3.7.2	Methodik	74
3.7.2.1	Extraktionsverfahren	74
3.7.2.2	ELISA	75
3.7.2.3	Ergebnisse	75
4	Diskussion	82
5	Zusammenfassung/ Summary	93
6	Literatur	97

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

ABTS	2,2'-azino-di-3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonat
Acetyl-DON	3  -Acetyl-Deoxynivalenol
BSA	Bovines Serumalbumin
CMO	Carboxymethyloxim
DAS	Diacetoxyscirpenol
DAS-HG	Diacetoxyscirpenol-Hemiglutarat
DAS-HS	Diacetoxyscirpenol-Hemisuccinat
DASP	Double Antibody Solid Phase
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
EDPC	1-Ethyl-3-(3-diaminopropyl)-carbodiimid
EIA	Enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMIT	Enzyme multiplied immunoassay technique
FCS	Fetales Kälberserum
FCS/PBS	mit fetalem Kälberserum versetzter Phosphatpuffer
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
GLC	Gas-Flüssig-Chromatographie
HG	Hemiglutarat
HRP	Meerrettichperoxidase
HS	Hemisuccinat
HSA	Humanes Serumalbumin
HT2-HS-HRP	mit Meerrettichperoxidase markiertes HT2-Toxin-Hemisuccinat
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
LPS	Lipopolysaccharid
4-MAS	4-Monoacetoxyscirpenol
15-MAS	15-Monoacetoxyscirpenol
MeOH	Methanol
OPD	o-Phenylendiamin
PBS	Phosphatpuffer
PHA	Phythämagglutinin
RIA	Radio-immunoassay
SCT	Scirpentriol
SIM	Select ion monitoring

T2-HS	T2-Toxin-Hemisuccinat
T2-HS-BSA	an bovines Serumalbumin gekoppeltes T2-Toxin-hemisuccinat
T2-HS-HRP	mit Meerrettichperoxidase markiertes T2-Toxin-Hemisuccinat
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin



1. Einleitung

Diacetoxyscirpenol (DAS) ist ein sekundärer Metabolit im Stoffwechsel vieler Schimmelpilze und gehört zur Mykotoxingruppe der Trichothecene. Es wird von vielen Spezies der Gattungen *Fusarium*, *Myrothecium* und *Trichothecium* produziert, die in der Natur weit verbreitet sind und unter den verschiedensten Bedingungen wachsen. Sie sind in Regionen mit gemäßigtem Klima, wie Nordamerika, Japan, Mittel- und Osteuropa als Parasiten oder Saprophyten auf vielen Kulturpflanzen oder daraus gewonnen Produkten anzutreffen. Trichothecene besitzen besonders wegen der Gefährdung der menschlichen und tierischen Gesundheit, aber auch als Verderbniserreger große Bedeutung.

Um die Menschen und Tiere vor der Aufnahme dieser hochgiftigen Substanzen schützen zu können, ist ein zuverlässiger Nachweis Voraussetzung. Im Mittelpunkt der Mykotoxinanalytik standen bisher die Aflatoxine, für die in manchen Ländern schon Höchstmengenverordnungen existieren. Erst in den letzten Jahren erlangten die Trichothecene vermehrt wissenschaftliches Interesse, was auch zur Erarbeitung einiger Analyseverfahren führte. Diese Methoden sind jedoch arbeits- und zeitaufwendig und eignen sich nur bedingt für routinemäßige Massenuntersuchungen von Lebens- und Futtermitteln. Da viele Mykotoxine als Haptene mit Proteinen konjugiert immunogen wirksam sind, werden am Institut schon seit Jahren enzymimmunologische Nachweisverfahren für Mykotoxine entwickelt (Biermann, 1980; Biermann und Terplan, 1980; Märtlbauer und Terplan, 1980; Esgin 1987;).

Da bisher in der Literatur noch kein solches Verfahren zum Nachweis von DAS beschrieben ist, sollte für diese Substanz ein Enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) entwickelt werden und seine Brauchbarkeit zunächst für die Untersuchung von Zerealien geprüft werden, zumal diese auch in diätetischen Lebensmitteln verarbeitet werden.

2 Schrifttum

2.1 Geschichte

Die Trichothecene sind eine erst seit wenigen Jahrzehnten bekannte Gruppe von chemisch verwandten, biologisch wirksamen Sekundärmetaboliten der Pilzgattungen *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* und *Stachybotrys*. Diese Substanzen wurden bisher nur selten in höheren Pflanzen gefunden.

1949 isolierten Freeman und Mitarbeiter aus einer Kultur von *Trichothecium roseum* eine antimykotisch wirksame Substanz, die sie "Trichothecin" nannten und die später der ganzen Trichothecengruppe den Namen gab (FREEMAN et al., 1949). Erst viele Jahre später wurde dann in *Fusarium scirpi* das phytotoxisch wirksame Diacetoxyscirpenol (DAS) gefunden (BRIAN et al., 1961). Diese Bezeichnung wurde aus dem Gattungsnamen des Pilzes und den vorhandenen zwei Acetylgruppen gebildet.

Die auch für höhere Lebewesen, einschließlich Säuger giftigen Trichothecene werden hauptsächlich in Getreidearten gebildet und stellen somit eine große Gefahr für die menschliche und tierische Gesundheit dar. Dies wird insbesondere durch zahlreiche z. T. dramatische Massenvergiftungen belegt, von denen Tausende von Menschen und Tieren in aller Welt betroffen waren.

Bereits im Jahre 1891 berichtete WORONIN über das "Taumelgetreide", dessen Verzehr in Gebieten von Deutschland und Schweden, sowie in Ussurien bei Menschen zu Kopfschmerzen, Schwindel, Schüttelfrost, Übelkeit, Erbrechen und Sehstörungen führte. Als Verursacher wurden die Schimmelpilze *Fusarium roseum*, *Gibberella saubinetii*, *Cladosporium herborum* und *Helminthosporium* sp. ermittelt. In den Notzeiten des Zweiten Weltkrieges kam es im Gebiet von Orenburg (UdSSR) zu den wohl bekanntesten und folgenreichsten Vergiftungsfällen durch Trichothecene. Diese als "Alimentary Toxic Aleukia" (ATA) bezeichnete Krankheit betraf über 10% der Einwohner. Die klinischen Erscheinungen waren Erbrechen, Hautentzündungen, Durchfall, Leukopenie, multiple Hämorrhagien, nekrotische Angina, Sepsis und Knochenmarksdegeneration (FORGACS und CARLL, 1962). Diese durch eine hohe

Mortalität (bis zu 60 %) gekennzeichnete Vergiftung, wurde durch Getreide verursacht, das man auf dem Felde überwintert hatte. Als auslösende Ursachen wurden nachträglich Trichothecene erkannt, insbesondere T2-Toxin, die von *Fusarium sporotrichoides*, *Fusarium poae* und *Cladosporium epiphyllum* produziert werden (UENO, 1972).

Diese Vorfälle lenkten das wissenschaftliche Interesse vermehrt auf das T2-Toxin, während das nicht weniger bedeutsame DAS für Jahre in den Hintergrund trat. Erst in jüngerer Zeit beschäftigen sich wieder namhafte Forscher (COPPOCK, 1984; BULLER, 1983) verstärkt mit dieser Substanz.

Tab.1 enthält eine kurze geschichtliche Zusammenfassung über die wichtigsten bekannt gewordenen Trichothecentoxikosen.

2.2 Chemische Eigenschaften

DAS ist ein natürlich vorkommendes Sesquiterpenoid. Die Sesquiterpenoide sind sekundäre Metaboliten des Pflanzenstoffwechsels und besitzen eineinhalbmal soviele C-Atome wie das Ausgangsmolekül Terpen (10 C-Atome). Wie aus Abb.1 hervorgeht, weist DAS ein Trichothecan-Grundgerüst mit vier Methylgruppen und einem trizyklischen Skelett aus Cyclohexan, Cyclopentan und einem sechsgliedrigem Oxyran auf. Eine olefinische Bindung am C-9,10 und ein Epoxydring am C-12,13 charakterisieren diese Verbindung als 12,13-Epoxytrichothecen oder Scirpen (GODTFREDSEN et al., 1967).

UENO ordnet das DAS in die erste von vier Trichothecengruppen ein. Die ersten beiden Gruppen unterscheiden sich nur durch das Vorhandensein einer Ketogruppe am C-8-Atom. Die dritte Gruppe ist durch zwei Epoxydgruppen im Molekül charakterisiert. Die vierte Gruppe bilden die makrozyklischen Trichothecene, die zwischen R-2 und R-3 ein großes Kohlenstoff-Sauerstoff-Ringsystem aufweisen. (UENO, 1983).

Tabelle 1: Geschichtlicher Überblick über die durch Trichothecene verursachten Toxikosen (modifiziert nach SNYDER, 1986)

Jahr und Toxikose	Gebiet	betroffene Spezies	Krankheits-symptome	auslösendes Futter- bzw. Lebensmittel	Pilz	Mykotoxin	Literatur
1890 Tausalge- toide	Deutsch- land, Schweden, Ussurien	Menschen, landwirt. Nutztiere	Kopfschmerzen, Vertigo, Nausea, Erbrechen	Wirs, Gerste, Roggen, Hafer, Hafer	Gibberella saubinetii, Cladosporium herbarum, Fusarium roseum, Helminthosporium species	Tricho- thecene	WORONIN (1891)
1923	Europä- ischer Teil der UDSSR	Menschen	Schwäche, Vertigo, Kopf- schmerzen, Erbrechen	Brot aus verschimmel- tem Roggen	Fusarium roseum	Tricho- thecene	DOUNIN (1926)
1931 - 1940 Stachyo- botryo- toxikose	Ukraine, Ungarn	Menschen, Schweine, Rinder, Pferde, Geflügel,	Schock, Stomatitis, Hämorrhagien, Leukopenie, zentralnervöse Störungen, Abort, Ulcer, Diarrhoe, Tod durch Atem- stillstand	Stroh, Hafer, Bohnen, Mehl, Spreu	Stachybotrys alternans	Satratoxin C, D, F, G, H, Roridine, Stachybo- tryotoxin A	FORGACS und CARLL (1962) EPPLEY et al. (1975, 1976) RODRICKS et al. (1976) UENO (1980)
1942 - 1947 Alimentary Toxic Alenkia (ATA)	UDSSR	Menschen Pferde, Schweine	Erbrechen, Hautentzündung, Diarrhoe, Leuko- penie, nekroti- sche Angina, Knochenmarks- degeneration	überwinterte Hirse, Weizen Gerste	Fusarium sporotri- choides Fusarium poae Cladosporium epiphyllum	T-2 Toxin, Neosolaniol, verwandte Tricho- thecene	FORGACS und CARLL (1962) UENO et al. (1970)

Fortsetzung Tabelle 1:

1958 - 1959	Ukraine, Osteuropa	Pferde, Rinder	wie Stachyo- botryotoxikose	Stroh, Heu, Hafer, Bohnen, Spreu	Stachybotrys alternans A und B, Satratoxin	RORICKS et al. (1974)
1960 - 1975	Hokkaido, Japan	Pferde	Konvulsionen, zyklische Be- wegung, Bradykardie	Bohnenhülsen	Fusarium solani	Neosolaniol, T-2 Toxin UENO et al. (1972)
1971	Wisconsin (USA)	Rinder	Hämorrhagien	Mais	Fusarium tricinctum	HSU et al. (1972)
1971	UDSSR	Pferde, Schafe, Schweine, Menschen	zentralnervöse Störungen, Hämorrhagien Hautentzündung, Zyanose, Leuko- penie, Tachycardie	Futtermittel	Dendrodochium toxicum und Verrucarine	UENO (1980)
1971 Akakabibyō (Red mold poisoning)	Japan	Menschen, Tiere	Erbrechen, Diarrhoe, Futterverweiger- ung, Hämorrhagien	Weizen, Hafer, Gerste, Roggen	Fusarium nivale	TATSUNO et al. (1968) Fusarenon X UENO et al. (1971 a, 1971 b)

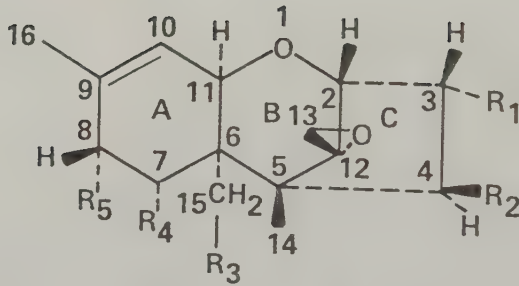


Abbildung 1: Basisstruktur der Trichothecene

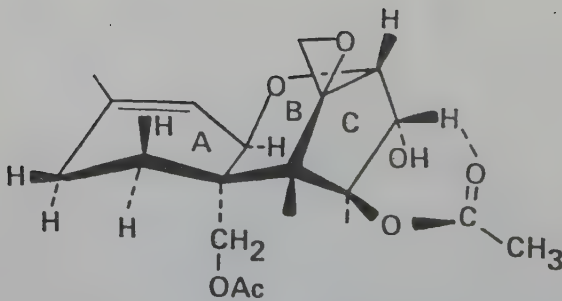


Abbildung 2: Stereochemische Konfiguration des DAS-Moleküls

Abb.1 zeigt die chemische Strukturformel der Trichothecene wie sie von DAWKINS (1966) vorgeschlagen wurde. Abb. 2 gibt die stereochemische Konfiguration des DAS wieder. Die wichtigsten mit DAS verwandten Trichothecene sind in Tab.2 aufgeführt. Die chemisch-physikalischen Eigenschaften werden von LÖFFLER et al.(1965) beschrieben. DAS bildet farblose optisch aktive Kristalle, die sich gut in Alkohol, Aceton, Chloroform und Pyridin lösen. Die Löslichkeit in Wasser, Ether, Propan, Hexan und Oktan ist jedoch gering. Das Molekulargewicht beträgt 366,41 und der Schmelzpunkt liegt bei 162 - 164 °C. Die Summenformel lautet $C_{19}H_{26}O_7$.

UENO (1980, 1983) beschreibt die verschiedenen chemischen Einflüsse auf die Stabilität der Trichothecene wie folgt: DAS ist eine relativ stabile Verbindung. Mildes alkalisches Milieu verseift die Esterbindungen des Moleküls und es entstehen geringer alkylierte Stoffe. Die Alkoholgruppen werden dabei zu Ketonen oder Aldehyden oxidiert. Die Doppelbindung am C-9,10 wird zu Dehydroverbindungen reduziert.

Eine Spaltung des Epoxydringes kann durch Säurehydrolyse oder Reduktion, z. B. mittels $LiAlH_4$, geschehen. Es entstehen dabei Apotrichothecene, die nur mehr geringe biologische Wirkung zeigen. Es wird vermutet, daß in Organismen zur Entgiftung der Trichothecene ein ähnlicher Mechanismus abläuft.

Längeres Kochen mit Wasser ergibt eine Hydrolyse unter Spaltung des Epoxydringes und Bildung einer neuen Bindung zwischen C-10 und C-13.

DAS zeigt keine Fluoreszenz und UV-Absorption. Aus diesem Grund erweisen sich dünnschichtchromatographische und photometrische Analysenmethoden als schwierig.

2.3 DAS bildende Schimmelpilze

DAS wird hauptsächlich von Fungi imperfecti der Gattung Fusarium gebildet. Diese Bezeichnung wurde erstmals 1908 von LINK verwendet. In der Systematik der Pilze gehören die Fusarien innerhalb

Tabelle 2: Seitenkettenreste für verschiedene Trichothecene
(Basisstruktur ist in Abb.1 dargestellt)

Trichothecen	Seitenkettenreste *				
	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5
3 α -acetyl-DAS	OAc	OAc	OAc	H	H
DAS	OH	OAc	OAc	H	H
T2-Toxin	OH	OAc	OAc	H	ISV
Neosolaniol	OH	OAc	OAc	H	OH
15-Monoacetoxy- scirpenol	OH	OH	OAc	H	H
HT2-Toxin	OH	OH	OAc	H	ISV
T2-Triol	OH	OH	OH	H	ISV
Verrucarol	H	OH	OH	H	H
T2-Tetraol	OH	OH	OH	H	OH
3 α -acetyl-deoxy- nivalenol	OAc	H	OH	OH	=O
Nivalenol	OH	OH	OH	OH	=O
Deoxynivalenol	OH	H	OH	OH	=O
Scirpentriol	OH	OH	OH	H	H

* Abkürzungen:

OAc = OCOCH_3

ISV = $\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

der Unterabteilung Deuteromycotina zur Familie der Tuberculariaceae (GEDEK, 1986). Fusarienkulturen bilden oft makroskopisch sichtbare wollige, flockige oder pilzige Geflechte (Luftmycel), die aus feinen fadenförmigen Röhren bestehen. (KABILKA, 1985). Diese Kulturen sind oft kräftig pigmentiert und weisen eine weiße, gelbe, orange, karminrote, purpurne, violette, braune oder dunkelbraune Farbe auf (BOOTH, 1971; WOLLENWEBER, 1932).

Die Fusarien sind weltweit verbreitet und wachsen unter den verschiedensten Bedingungen. Sie leben als Parasiten oder Saprophyten auf vielen Kulturpflanzen, besonders auf Getreide und Gemüse. Aus diesem Grund sind die Fusarien bedeutende Verderbniserreger von landwirtschaftlichen Produkten. Die Bildung von Pilzgiften ist stark von der Temperatur, dem Nährsubstrat und der Spezies abhängig. Höhere Temperaturen und flüssiges Nährmedium fördern die DAS-Produktion (SIEGFRIED, 1977).

Die Klassifikation der Fusarien ist aufgrund der vielen verschiedenen Einteilungsschemata sehr schwierig. BOOTH (1971) entwickelte für die toxinbildenden Fusarien ein brauchbares Einteilungssystem: Auf diesem System basierend nennt UENO (1983) folgende DAS-bildenden Fusarienspecies: *Fusarium* (F.) *equiseti*, F. *acuminatum*, F. *sporotrichoides*, F. *sulphureum*, F. *poae*, F. *solani* var. *coerulium* und F. *moniliiforme*. Diese Arten produzieren jedoch meistens verschiedene Trichothecene gleichzeitig, so daß bei einem Befall eines Lebensmittels mit einer bestimmten Fusarienspecies häufig eine Kontamination mit mehreren Toxinen auftritt und die krankheitsauslösende Noxe nur schwer zu ermitteln ist.

2.4 Natürliches Vorkommen von DAS

DAS-bildende Fusarien sind weltweit verbreitet, doch sind die Berichte über das natürliche Vorkommen von DAS sehr spärlich. Dies liegt zum einen daran, daß geeignete empfindliche Nachweisverfahren noch nicht genügend entwickelt sind, um sie in großangelegten Massenuntersuchungen anzuwenden, zum anderen daran, daß

in den einzelnen Ländern die Futtermittel nicht routinemäßig auf Trichothecene untersucht werden. Außerdem gibt es weltweit keine Höchstmengen für irgendein Trichothecen. Die verfügbaren Daten basieren deshalb meistens auf sporadischen Untersuchungen mit beschränkter Probenanzahl oder wurden aufgrund von bekannt gewordenen Vergiftungsfällen gewonnen. Lediglich von GAREIS et al. (1985) wurden routinemäßig angelegte Futtermittelanalysen durchgeführt. Die Tab. 3 gibt eine kurze Zusammenfassung über das natürliche Vorkommen von DAS.

BAUER et al. (1980) stellten in einer über drei Jahre laufenden Untersuchung fest, daß fast jede aus den USA stammende Maisprobe mit Fusarien belastet war, während im gleichen Untersuchungszeitraum nur aus 28,2 % der europäischen Maisproben Pilze dieser Gattung zu isolieren waren.

Unter den einheimischen Getreidearten war der Hafer am stärksten kontaminiert. 57,6 % der Haferproben wiesen Fusarien auf, während der Weizen mit 35,1 % belastet war. In Mais und Gerste konnten zu 28,2 % bzw. 21,4 % Fusarien nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse belegen deutlich die weltweite Bedeutung der Fusarien als potentielle Lebens- und Futtermittelvergifter.

MIROCHA et al. (1976) vermuten deshalb, daß das Vorkommen von DAS-kontaminierten Futtermitteln viel größer ist als ursprünglich angenommen wurde.

2.5 Biochemische Wirkungen des DAS

Nach UENO (1973 a) gehören die Trichothecene zu den Substanzen, die die Proteinsynthese in tierischen Zellen am stärksten hemmen. UENO et al. (1969) untersuchten die Auswirkungen von DAS auf die Proteinsynthese in Kaninchenreticulozyten. Die ^{14}C -Leucinaufnahme dieser Zellen diente als Maß für die Höhe der Proteinbildung. Eine Konzentration von 0,05 μg DAS/ml hemmte die ^{14}C -Leucinaufnahme um 53,7%. 0,1 μg DAS/ml führten zu einer 91,1 %igen Abnahme des Leucinverbrauches.

Tabelle 3: Natürliches Vorkommen von DAS.

(modifiziert nach COPPOCK, 1984)

Futtermittel	Land	Gehalt (ppm)	Referenz
Gerste	Kanada	*	CIRILLI (1983)
	Italien	*	CIRILLI (1983)
	BRD	0,2	BAUER et al. (1980)
Hafer	Australien	*	CIRILLI (1983)
	Italien	*	CIRILLI (1983)
	BRD	*	BAUER et al. (1980)
	Ungarn	*	SZATHMARY (1983)
Mais	Argentinien	*	CIRILLI (1983)
	Ungarn	1,0 - 1,5	UENO (1980)
	BRD	31,5	SIEGFRIED (1977)
	Yugoslawien	*	CIRILLI (1983)
	Italien	*	CIRILLI (1983)
Maissilage	Italien	0,3	CIRILLI (1983)
Mischfutter	BRD	0,125	GAREIS et al. (1985)
	USA	0,38 - 0,5	MIROCHA et al. (1976)
	Italien	0,2	CIRILLI (1983)
Reis	China	*	CIRILLI (1983)
	Italien	*	CIRILLI (1983)
Weizen	BRD	0,05	GAREIS et al. (1985)
	Kanada	*	CIRILLI (1983)
	Frankreich	*	CIRILLI (1983)
	USA	*	CIRILLI (1983)
Roggen und Hafer	Kanada	0,8	ABRAMSON et al. (1983)

* : ohne Angaben

LIAO et al. (1976) erforschten den Wirkungsmechanismus des DAS mit Hilfe von HeLa-Zellen (humane Cervixkarzinomzellen). Sie stellten fest, daß die Trichothecene auf der Basis der Reversibilität ihrer Wirkung in zwei Gruppen eingeteilt werden können, und zwar in irreversible (DAS, T2-Toxin) und reversible Hemmer (Trichodermin, Crotoxin) der Proteinsynthese. DAS senkt schon in geringer Menge (40 nMol) die Proteinsynthese irreversibel um 50%, während die DNS-Bildung erst bei 140 nMol um die Hälfte abnimmt. Die Auswirkungen auf die RNS-Synthese sind jedoch gering. Erst bei 100 µMol tritt eine 20 %ige Abnahme ein. DAS blockiert die Initiationsphase der Proteinsynthese (Typ I-Inhibitor, UENO, 1980) und spaltet die Polysomen in Monosomen. DAS besetzt an den Ribosomen das aktive Zentrum der Peptidyltransferase und verhindert somit den ribosomalen Zyklus (UENO, 1977). Die Anlagerung des Toxins erfolgt wahrscheinlich kovalent und unter Aufspaltung des Epoxydringes (CUNDLIFFE et al., 1974). Es gibt aber auch Trichothecene (z. B. Trichodermin, Crotoxin), die erst in der Terminations- oder Elongationsphase angreifen (Typ E-Inhibitor, UENO; 1980).

Trotz ihrer engen chemischen Verwandtschaft greifen die Trichothecene auf zwei unterschiedlichen Wegen in den Eiweißstoffwechsel des Körpers ein. Dieser Widerspruch läßt sich folgendermaßen erklären: Typ I-Inhibitoren können in der Elongationsphase nicht mehr wirken, da die Oligopeptidyl-t-RNS die P-Seite der Ribosomen besetzt hat und somit eine Bindung dieser Inhibitoren verhindert (UENO, 1980).

WEI und McLAUGHLIN (1974) erforschten die Struktur-Wirkungsbeziehung der Trichothecene. Ihrer Ansicht nach sind der Sauerstoff enthaltende Substituent am C-15-Atom und die Hydroxygruppe am R-1 des DAS-Moleküls für die Beeinflussung der Proteinsynthese verantwortlich.

Die verringerte DNS-Bildung ist die zwangsläufige Folge der Proteinsynthesehemmung. Die RNS-Produktion wird von DAS nicht verändert.

2.6 Toxische Wirkungen des DAS

Die Toxizität der Trichothecene ist von ihrer Typzugehörigkeit abhängig. Die Toxine der Gruppe D (z. B. Verrucaridin A, Roridin A) sind giftiger als die der Gruppe A (z. B. DAS, T2-Toxin) und C (z. B. Nivalenol). Die nichtmacrozyklischen Diepoxyde der Gruppe D (z. B. Crotocin) besitzen die geringste Giftigkeit. Die LD₅₀-Dosen für die verschiedenen Tierarten sind in Tab.4 dargestellt.

Junge Organismen sind gegen DAS empfindlicher als adulte, wobei geschlechtsspezifische Unterschiede innerhalb einer Art nicht (UENO, 1977) bestehen. Die allgemeinen Zeichen einer Trichothecenvergiftung sind: Emesis, Erbrechen, Entzündung der Schleimhäute, Hämorrhagien, Futterverweigerung, Diarrhoe, Abort, Veränderungen des Blutbildes, nekrotische Angina, nervöse Störungen und Zerstörung des Knochenmarks. Die histopathologischen Veränderungen ähneln stark dem Bild eines Strahlenunfalles (radiomimetischer Effekt) und betreffen hauptsächlich die Zellen des Gastrointestinaltraktes, der Milz, des Thymus und des Knochenmarks (UENO, 1983).

STÄHELIN et al. (1968) stellten in ihren Untersuchungen mit DAS nach einer einmaligen Injektion der mittleren letalen Dosis bei Maus, Katze, Kaninchen und Hund Apathie, verlangsamte Atmung, Zyanose, Diarrhoe, blutigen Stuhl, Erbrechen, Tremor und Tachycardie fest.

Bei Ratten traten bei chronischer Vergiftung Gewichtsverlust, Hämorrhagie und Diarrhoe auf. Die mit einer Dosis von 0,54 mg DAS/kg KGW behandelten Tiere zeigten nach vier Wochen eine deutliche Leukopenie und Anämie. Der Leukozytenwert betrug 41 % des Ausgangswertes und die Erythrozytenzahl 54 %. Im Knochenmark fand sich eine deutlich verminderte Granulopoese. Ratten, die während sechs Wochen täglich mit steigenden Dosen behandelt wurden, wiesen eine Leukopenie auf, die im Laufe des Versuches wieder zurückging. Bei Dosiserhöhung kam es erneut zum Absinken der Zahl der weißen Blutkörperchen.

Bei Hunden trat im Langzeitversuch Gewichtsverlust und blutiger Stuhl auf. Eine anfängliche Leukozytose ging in eine Leukopenie

Tabelle 4: LD₅₀- Dosen (mg/kg KGW) für DAS

Species	Applika- tionsart	Dosis	Referenz
Maus, adult	i. v.	12,000	STÄHELIN et al. (1968)
	i. v.	10,000	LÖFFLER et al. (1965)
	i. p.	23,000	UENO et al. (1973 a)
	p. o.	8,300	HATZ (1987)
neugeboren	s. c.	0,170	UENO (1980)
Ratte	i. v.	1,300	STÄHELIN et al. (1968)
	i. p.	0,750	BRIAN et al. (1961)
	p. o.	7,300	SIEGFRIED (1977)
Kaninchen	i. v.	1,000	STÄHELIN et al. (1968)
Hund	i. v.	1,1000	STÄHELIN et al. (1968)
Schwein	i. v.	0,376	WEAVER et al. (1978)
Huhn, 1 Tag alt	p. o.	3,820	CHI et al. (1978)
7 Tage alt	p. o.	5,000	UENO (1980)
Meerschweinchen	p. o.	2,140	KRIEGLEDER (1980)

über. Nach dem Absetzen der Behandlung waren Leukopenien mit 1500 Zellen/mm³ noch reversibel.

Schweine zeigten bei intravenöser Applikation nach zwanzig Minuten Erbrechen und Lethargie. Häufiger Absatz von wässerigen Fäces trat nach drei Stunden auf und ab der sechsten Stunde entwickelte sich eine Nachhandparese. Eine sich verschlimmernde Entkräftung bis zur achtzehnten Stunde führte zum Tod der Tiere. Schweine, die diesen Zeitpunkt überstanden hatten, überlebten in der Regel. Die Rekonvaleszenz dauerte acht Tage. Bei den verendeten Tieren waren Darmhämorrhagien und schwere Kongestionen der Jejunum- und Ileummucosa festzustellen. Akute Nekrosen der germinalen Zentren der Mesenteriallymphknoten und der Milz konnten ebenfalls beobachtet werden (WEAVER et al., 1978).

WEAVER et al. (1981) untersuchten auch die Auswirkungen einer chronischen Toxinverabreichung an Schweine. Bei einem über neun Wochen angelegten Fütterungsversuch entwickelten die Tiere nach vierzehn Tagen multifokale orale Läsionen. Die Zellen des Ileum waren hyperplastisch. Die schmerzhaften Veränderungen im Mundraum bedingten einen verringerten Futterverzehr und damit eine mangelnde Gewichtszunahme. Totale Futterverweigerung trat bei 10 ppm DAS im Futter in Erscheinung. Erst unter 2 ppm DAS in der Ration wurde die Nahrung bedenkenlos gefressen. Oral verabreicht kann DAS jedoch nicht für sich alleine klinische oder subklinische Hämorrhagien hervorrufen, d. h. daß zur Auslösung dieser Veränderungen noch andere Noxen notwendig sind.

Einen Tag alten Broilerküken wurde eine Diät mit 5 ppm DAS gefüttert. Sie zeigten gelbliche plaqueähnliche Läsionen am Schnabel, an der Zunge und an den Mundwinkeln (CHI et al. 1978 a). In einem akuten Toxizitätstest wurden ebenfalls an Eintagesküken DAS-Konzentrationen von 2,0 - 6,8 mg/kg KGW verabreicht. Die klinischen Symptome waren Inappetenz, Asthenie, Diarrhoe und Koma. Die mittlere Sieben-Tage-LD₅₀ wurde mit 3,8 mg DAS/kg KGW ermittelt (CHI et al., 1978 b).

HOERR et al. (1982) erzeugten bei sieben Tage alten Hühnerküken mit 2,5, 3,0 und 3,5 mg DAS/kg KGW eine Mykotoxikose. Einige Tiere starben an Dehydratation und Schwäche. Die Überlebenden wiesen eine mangelnde Gewichtszunahme, abgesenkten Hämatokrit, schlecht ausgebildete Federn und schwachgelblich gefärbte Schnabel und Ständer auf.

ALLEN et al. (1982) verabreichten 36-Wochen-alten Leghorn-Hühnern acht Wochen lang 15 ppm DAS. Daraufhin sank Legeleistung, Futtermittelverbrauch, Fruchtbarkeit und Schlupffähigkeit der Küken. Eine Dosisreduzierung auf 0,5 ppm beeinträchtigte lediglich die Schlupffähigkeit um 24 %. Bei Absetzen der Noxe stellten sich wieder die physiologischen Zustände ein.

Trichothecene besitzen eine stark hautreizende Wirkung. So führt DAS auf der Haut von Labortieren zu Hämorrhagien und Epidermisnekrosen. Die Haarfollikel und die Dermis zeigten starke degenerative Erscheinungen. Diese Eigenschaft wird zum semiquantitativen Nachweis von Trichothecenen mittels Hauttest verwendet (UENO et al., 1970). Die Haut des Meerschweinchens ist für dieses Nachweisverfahren besonders geeignet, da sie viel empfindlicher reagiert als die Haut von Mäusen oder Kaninchen.

2.7 Wirkungen auf das Immunsystem

Bei Intoxikationen durch trichothecenhaltiges Futter zeigen die Tiere deutliche Spuren einer Immunsuppression. Die biologischen Effekte, besonders leichte Infektanfälligkeit, Leukopenie und die Hemmung der Proteinsynthese, veranlaßten einige Autoren die Auswirkungen des DAS auf das Immunsystem zu untersuchen. STÄHELIN et al. (1968) berichteten als eine der ersten über die Beeinflussung der Antikörperbildung durch DAS. Sie untersuchten bei Mäusen, die täglich mit 2 - 4 mg DAS/kg KGW behandelt worden waren, den Antikörpertiter gegen Schaferythrozyten und stellten fest, daß dieses Toxin in subtoxischen Dosen die Immunantwort hemmt.

ROSENSTEIN et al. (1979) studierten die Entwicklung der Antikörpertiter in Mäusen, denen ein Fusarium-Rohextrakt und DAS verabreicht worden waren. Der Rohextrakt hemmte bei einem Sechzehntel der LD₅₀-Dosis den Agglutinititer gegen das T-zellabhängige Schaferythrozytenantigen. Reines DAS senkte ab 1,5 mg/kg KGW den Antikörperspiegel. Das Thymusgewicht nahm bei dieser Konzentration mit steigender Dosis ab. Die Antikörperbildung wurde jedoch schon verringert, bevor die Auswirkungen am Thymus deutlich wurden. Andere Organe, wie Leber, Niere und Knochenmark wiesen keine Veränderungen auf. Die Immunsuppression war reversibel und verschwand sechs Tage nach dem Absetzen der Noxe. Niedrige Konzentrationen über längere Zeit (ca. fünfzehn Tage) führten zu einer geringen Variation des Thymus- und Milzgewichtes. Die Antikörperbildung war dagegen stark abgesunken. Die Fähigkeit der Trichothecene die Proteinsynthese zu hemmen und die daraus resultierende mangelnde Bildung funktionsfähiger lymphatischer Zellen dürfte für diesen Zustand verantwortlich sein. Eine direkte Wirkung des DAS auf die Nebennieren konnte ausgeschlossen werden, da Tiere, denen diese Organe entfernt worden waren dieselbe Beeinträchtigung der Immunantwort zeigten.

In einer anderen Arbeit berichtete dieselbe Gruppe über die Steigerung der Immunantwort gegen die T-zellenabhängigen Antigene Polyvinylpyrrolidon und Dinitrophenylficoll durch eine chronische DAS-Applikation. Der Mechanismus dieser Reaktion ist noch unklar, doch wird vermutet, das DAS die T-Suppressor-Zellen beeinflusst (ROSENSTEIN et al., 1981).

LAFARGE et al. (1979) stellten fest, daß DAS in vitro die mit Phythämagglutinin (PHA, T-Zellen-Mitogen) und Lipopolysaccharid (LPS, B-Zellen-Mitogen) stimulierte T- und B-Lymphozyten hemmt. BULLER (1983) bestätigte dies und fand heraus, daß diese Wirkung nicht spezifisch für T- oder B-Zellen ist. Niedrige DAS-Konzentrationen hatten auf diese einen stimulierenden Effekt. B-Zellen wurden in ihrem Wachstum stärker angeregt und waren gegen hemmende Einflüsse des DAS empfindlicher. Mit Toxin vorbehandelte Mäuse zeigten in vivo eine verstärkte Reaktion gegenüber den Lymphozytenmitogenen PHA und Concanavalin A (T-Zellen-Mitogen)

als Kontrolltiere. Dies könnte durch den metabolischen Abbau des DAS bis zu niedrigen Konzentrationen, die stimulierend wirken, bedingt sein. BULLER (1983) lokalisiert den Angriffspunkt des DAS im retikuloendothelialen System. Eine einmalige hohe Dosis hemmte die Migration der polymorphkernigen Lymphozyten in vitro und schädigte die zellgebundenen und wandernden Phagozyten. Die zellgebundene Abwehr wurde dadurch verringert und die Mortalität von Mäusen durch experimentell erzeugte Infektionen mit *Staphylococcus aureus* und *Listeria monocytogenes* nahm stark zu. Es ist noch unbekannt ob DAS oder seine Stoffwechselprodukte die immunsuppressive Wirkung auslösen.

2.8 Metabolismus

Der Stoffwechsel von DAS ist wenig erforscht.

BAUER et al. (1985 a,b) demonstrierten in einem in-vivo-Experiment, daß oral verabreichtes DAS sehr schnell (30 - 120 min) als 15-Monoacetoxyscirpenol (15-MAS) und Scirpentriol (SCT) in Kot, Urin und auch Erbrochenen ausgeschieden wird.

Im Organismus werden vom DAS-Molekül durch schrittweise Hydrolyse der Esterbindungen am C-4 und C-15-Atom Acetylgruppen abgespalten. Es entstehen 15-MAS als Hauptmetabolit und in sehr geringem Umfang auch SCT. Die deacetylierten Zwischenprodukte werden an Glucuronsäure gekoppelt und über Fäces, Urin und Milch ausgeschieden (Gareis et al., 1986). Außerdem spaltet die Magen-Darmflora mit Hilfe noch unbekannter Enzyme den Epoxydriing des Trichothecengrundgerüsts auf und es entstehen Apotrichothecene, die nach Resorption vom Organismus teilweise nach vorheriger Hydrolyse zu deepoxidiertem 15-MAS oder SCT glucuronidiert werden (BAUER, 1987). Diese Vorgänge laufen sehr schnell ab, denn schon dreißig Minuten nach der Toxinapplikation ist die maximale Glucuronidierungsrate erreicht (ROUSH et al., 1985; GAREIS et al., 1986).

Die Abspaltung der Acetylgruppen des DAS-Moleküls wird durch eine unspezifische mikrosomale Esterase hervorgerufen, die nur am C-4-Atom angreift (OHTA et al., 1978). Die Reste am C-3 und C-8-Atom (R-1 und R-5) sind dabei von hervorragender Bedeutung. Eine Hydroxylgruppe am R-1 und eine Acetylgruppe oder Wasserstoffatome am R-5 ermöglichen es der Esterase, die Trichothecene in ihre entsprechenden C-4-deacetylierten Produkte umzuwandeln.

KIESSLING et al. (1984) untersuchten den Abbau von DAS durch die Mikroorganismen des Schafpansensaftes. Sie stellten fest, daß DAS innerhalb einer Stunde von den Protozoen fast vollständig zu MAS deacetyliert wird. Die Stoffwechselaktivität der Bakterien spielte dabei nur eine untergeordnete Rolle.

2.9 Nachweisverfahren

Für den qualitativen und quantitativen Nachweis von DAS wurden verschiedene physikalisch-chemische, biologische und immunologische Nachweisverfahren entwickelt.

Die biologischen Nachweisverfahren verfügen über eine hohe Empfindlichkeit, aber nur über eine geringe Spezifität. Die physikalisch-chemischen Methoden sind dagegen sehr spezifisch, aber nur wenig empfindlich (EPPLEY, 1975).

2.9.1 Physikalisch-chemische Verfahren

Diese Methoden umfassen Dünnschichtchromatographie (DC), Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)-, Gaschromatographie (GC), Gas-Flüssig-Chromatographie (GLC) sowie die Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS).

Diesen Analysen gehen meistens umfangreiche Extraktions- und Reinigungsschritte voraus, um das Untersuchungsmaterial von Störsubstanzen zu befreien (EPPLEY, 1979).

2.9.1.1 Dünnschichtchromatographie

Das Fehlen von Fluoreszenz- und UV-Absorptionseigenschaften erschwert den Nachweis von DAS mittels DC. Erst nach vorangegangener Derivatisierung mit Schwefelsäure (UENO et al., 1973 b), p-Anisaldehyd (SCOTT et al., 1970), 4-(p-Nitrobenzylpyridin) (TAKITANI et al., 1979) oder Nicotinamid-2 acetylpyridin (SANO et al., 1982) bei 100 - 150 °C kann aufgrund von verschiedenen Farb- und Fluoreszenzreaktionen ein Nachweis geführt werden. Die Tab.5 faßt die wichtigsten Farb- und Fluoreszenzreaktionen zusammen. Die DC auf Silicagel-Platten ist die verbreitetste Methode zum Nachweis von Trichothecen, da sie leicht und problemlos durchzuführen ist.

DAWKINS (1966) berichtet, daß DAS mit p-Dimethylaminobenzylaldehyd in konzentrierter HCl (Ehrlich's Reagenz) eine intensive violette Farbe ergibt.

In dünnschichtchromatographischen Multimyko toxinanalysen lassen sich neben DAS und anderen Trichothecen auch noch zahlreiche andere Pilzgifte nachweisen (NOWOTNY et al., 1983).

2.9.1.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

SCHMIDT et al. (1981) verwendeten zum Nachweis von DAS, dem verwandten T2-Toxin und dem HT2-Toxin aus mit Fusarium kontaminiertem Reis eine HPLC-Methode. Die Extrakte wurden mit einer C-18 Sep-Pak-Patrone gereinigt und mittels einer Bondapak C-18-Säule nachgewiesen. Die besten reproduzierbaren Ergebnisse wurden mit einem Methanol/Wassergemisch von 60:40 in der mobilen Phase und einer Durchflußrate von 2,0 ml/min erreicht. Die Retentionszeiten betrugen für DAS 9,8 min, für T-2 toxin 17,6 min und für HT-2 toxin 13,0 min.

Tabelle 5: Farb- und Fluoreszenzreaktionen des DAS nach
Behandlung mit verschiedenen Sprühreagenzien.
(in Anlehnung an KABILKA, 1985)

Sprühreagenz	Farbe nach Besprühen	Fluoreszenz nach Besprühen (bei 360 nm)	Autor
Schwefelsäure	grau-braun	blau	UENO et al., (1973 b)
p-Anisaldehyd	violett	blau	SCOTT et al., (1970)
4-(p-Nitrobenzyl)- pyridin *		blauviolett	TAKITANI und ASABE, (1979)
Nicotinamid- 2-acetylpyridin *		blau	SANO et al., (1982)

* Spezifische Reaktion des Sprühreagenzes mit der 12,13- Epoxy-
gruppe

2.9.1.3 Gas- Flüssig- Chromatographie

In der Gas-Flüssig-Chromatographie erfolgt die Trennung eines Substanzgemisches an einer chromatographischen, gasdurchströmten Säule. Zum Nachweis von einzelnen Substanzen bedient man sich dann spezieller Detektoren, wie z. B. Flammenionisationsdetektor oder Elektroneneinfangdetektor.

ROMER et al. (1978) wiesen DAS mit diesem Verfahren nach. Die Analysenprodukte wurden nach einem Extraktions- und Reinigungsschritt mit Heptafluorobutrylimidazol verestert. Die Trennung erfolgte durch eine SE-30 Glassäule und zur Messung wurde ein ⁶³Ni-Elektroneneinfangdetektor verwendet. Die Nachweisgrenze für dieses Toxin lag in Mais bei 25 ng/g. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate betrug 97 % und der Variationskoeffizient

10 %.

GAREIS (1982) derivatisierte DAS mit N-Heptafluorobutyryl-imidazol, N-Methylbis(trifluoroacetamid) und einem Silylreagenz. 25 - 50 ppb war die Nachweisgrenze bei der Elektroneneinfangdetektion und 50 - 125 ppb bei der Flammenionisationsdetektion. Die Wiederfindungsrate lag bei 74,4 %.

2.9.1.4 Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie

GC-MS ist eine gute analytische Methode, die eine präzise Identifizierung von Trichothecenen ermöglicht, auch wenn interferierende Substanzen in der Probe vorkommen (UENO, 1980). Die Trichothecene und ihre Derivate besitzen charakteristische Massenspektren, deren Daten mit Hilfe eines Computers ausgewertet werden. GAREIS et al. (1985) wiesen mit diesem Verfahren Trichothecene in Futtermitteln nach. Eine dem Massenspektrometer vorgeschaltete GC-Säule trennte das Substanzgemisch, das anschließend durch Elektronenstoß oder chemisch ionisiert und massenspektrometrisch analysiert wurde. Kriterien für eine positive Identifizierung waren der Nachweis charakteristischer Ionen, deren relative Intensitäten und die Übereinstimmung der Retentionszeit mit der des entsprechenden Standardtoxins. In Weizen und Mischfutter wurden 50 bzw. 125 µg DAS/kg nachgewiesen. In Tab.6 sind die Schlüsselionen der einzelnen Trichothecene bei unterschiedlicher Ionisation zusammengestellt (GAREIS et al., 1985).

Beim normalen Scanbetrieb des Gerätes werden die Massenspektren der einzelnen Komponenten erfaßt und aufgezeichnet, wenn sie von der GC-Säule eluiert werden. Das SIM-Verfahren (select ion monitoring) steigert die Sensitivität und Selektivität der GC-MS-Methode, indem in regelmäßigen Abständen unabhängig von der Elution der Analysenkomponenten, nach trichothecenspezifischen Massen gesucht wird. Tab.7 zeigt einen Vergleich der Nachweisgrenzen physikalisch-chemischer Verfahren für verschiedene Trichothecene.

Tabelle 6: Vergleich selektiver Ionen verschiedener Trichothecene (Trifluoroacetylderivate) bei der GC-MS-Analyse mit Elektronenstoßionisation und chemischer Ionisation in Methan.
(GAREIS et al., 1985)

Trichothecene	Retentionszeit (min)	Schlüsselionen (m/e) ⁺		
		Elektronenstoßionisation (70 eV)	Chemische Ionisation (Methan)	
Verrucarol	4:25	91/105/344/443/458 (M ⁺)	345/459 (M + H) ⁺	
MAS	5:20	n.a.	457/517 (M + H) ⁺	
T2-Triol	7:01	85/121/234/455/570	455/671 (M + H) ⁺	
Neosolaniol	7:03	79/185/327/374/401	401/575 (M + H) ⁺	
DAS	7:06	91/105/329/402	403/463 (M + H) ⁺	
HT2-Toxin	7:43	85/121/455/532	455/617 (M + H) ⁺	
T2-Toxin	9:15	85/180/401	401/563 (M + H) ⁺	

n.a.: nicht analysiert (M⁺): Molekülion (M + H)⁺: protoniertes Molekülion

Tabelle 7: Nachweisgrenzen verschiedener Trichothecene bei Anwendung physikalisch-chemischer Methoden
(nach MIROCHA, 1979).

Trichothecen	Dünnschicht- chromatographie µg/spot (1)	Hochdruck- flüssigkeits- chromatographie µg/µl Injektion	Gas-flüssig- Chromatographie µg/µl Injektion	Gas-flüssig-Chromatographie- Massenspektrometrie Normaler Scan- betrieb µg/µl Injektion	µg/µl Injektion
T2-Toxin	0,07 - 0,10	1,0	0,03 - 0,05	0,03 - 0,05	0,02
Neosolaniol	0,07 - 0,10	+	0,03 - 0,05	0,03 - 0,04	0,02
DAS	0,50	+	0,05	0,03	0,007 - 0,01
MAS	0,50	+	0,03 - 0,05	0,03 - 0,05	0,015
Deoxynivalenol	1,0 - 1,5	+	0,02 - 0,03	0,02	0,007
+ : keine Angaben (1) : Sprühreagenz H ₂ SO ₄ SIM : selected ion monitoring					

2.9.2 Biologische Verfahren

Bei diesen biologischen Analysenmethoden werden lebende Organismen oder Zellkulturen zum Toxinnachweis verwendet. Dabei werden die antibiotischen, antiprotozoischen, insektiziden, phytotoxischen und zytotoxischen Eigenschaften des DAS herangezogen (UENO, 1980). Die Tab.8 gibt einen kurzen Überblick über die beschriebenen Testsysteme. Diese Methoden besitzen eine höhere Nachweisempfindlichkeit als physikalisch-chemischen Verfahren und bedürfen eines geringeren materiellen Aufwandes, sind aber relativ unspezifisch. Die Verwendung von höherentwickelten Organismen ist jedoch unter tierschützerischen Aspekten betrachtet nicht ganz unproblematisch.

2.9.3 Immunologische Verfahren

In neuester Zeit finden in verstärktem Maße sehr spezifische und sensitive immunologische Techniken Anwendung. Diese eignen sich besonders für routinemäßige Massenuntersuchungen, da die Auswertung von Computern gesteuert und gespeichert werden kann. Die Entwicklung von spezifischen mono- und polyklonalen Antikörpern gegen Trichothecene ermöglichte es in letzten Jahren einfache und sensible immunologische Testsysteme zu erstellen (CHU, 1986). Der Radioimmuno-Assay (RIA) und der Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) erlauben einen Toxinnachweis von 0,1 - 0,5 ng/Assay bzw. 2,5 - 25 pg/Assay. Sie sind somit zur Zeit die empfindlichsten Nachweisverfahren für diese Substanzen. RIA und ELISA basieren auf der Konkurrenz eines markierten mit einem gesuchten unmarkierten Toxin um die spezifischen Bindungsstellen der Antikörper im Untersuchungssystem. Im RIA wird radioaktiv-, im ELISA enzym-markiertes Toxin verwendet.

Tabelle 8: Biologische Nachweisverfahren für DAS
(in Anlehnung an GAREIS, 1983)

Testsystem	Nachweis- grenze	spezifische Wirkung	Autor
Pflanzen			
Erbsen (<i>Pisum sativum</i>)	1 µg/ml	Wachstums- hemmung bei Sämlingen	BRIAN et al. (1961)
Bohnen (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	0,25 µg/ml	Wachstums- hemmung der Blätter	BRIAN et al. (1961)
Pollen (<i>Nicotina silvestris</i>)	20 ng/ml	Keimhemmung der Pollen	SIRIWARDANA et al. (1978)
Bakterien (<i>Bacillus thuringiensis</i>)	5 mg/ml	Hemmhofmethode	BOUTIBONNES (1979)
Arthropoden (<i>Artemia salina</i>)	0,08 µg/ml	LD ₅₀ für Larven	EPPLEY (1974)
Vertebraten Hühnerembryo	0,5 µg/Ei	Absterben	GEDEK (1972)
Maus	40 µg/g	Trinkwasserver- weigerung	BURMEISTER et al. (1980)
Meerschweinchen	0,2 µg/Test	Hauttoxizitäts- test	UENO et al. (1970, b)
Zellkulturen MDCK	0,01 µg/ml	Cytotoxizität	WERMTER (1980)
Kaninchenreti- kulozyten	0,05 µg/ml	Hemmung der Proteinsynthese	UENO et al. (1969)

2.9.3.1 Antikörpergewinnung

Um immunologische Nachweise durchführen zu können, benötigt man eine ausreichende Menge spezifischer und empfindlicher Antikörper.

Die Antikörpergewinnung ist jedoch kompliziert und zeitaufwendig. Die Hauptschwierigkeit liegt darin, daß die Trichothecene aufgrund ihres geringen Molekulargewichtes (< 400) nicht immunogen wirkende Haptene darstellen. Erst nach Konjugation an ein Protein- oder Polypeptidträgermolekül kann man sie zur Immunisierung verwenden. Um diese Kopplungsreaktionen durchführen zu können, müssen zuerst reaktive Gruppen in das Toxinmolekül eingebaut werden. Dazu werden freie Hydroxylgruppen mit Hilfe von bifunktionellen Säureanhydriden in reaktive Hemisuccinate (HS) oder Hemiglutarate (HG) überführt. Stehen Carbonylgruppen zur Verfügung können O-Carboxymethyloxime (CMO)-Derivate gebildet werden. Diese reaktiven Gruppen werden dann mittels der Carbodiimid- oder der gemischten Anhydridtechnik an das Trägerprotein (meistens BSA oder HSA) konjugiert (CHU, 1986). Anschließend werden Versuchstiere, v. a. Kaninchen, mit diesem Toxin-Protein-Konjugat immunisiert. Nach einigen Wochen werden die Tiere restimuliert und entblutet. Das Serum wird mit 70 %iger gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt um die Antikörper von den übrigen Proteinbestandteilen abzutrennen.

2.9.3.2 RIA

Der RIA wurde erstmals von YALOW und BERSON (1959) entwickelt und erlangte seitdem große Bedeutung in der medizinischen Forschung und in der Routinediagnostik.

Das nach oben beschriebenen Verfahren gewonnene Antiserum wird simultan mit einer konstanten Menge radioaktiv-markierten Toxins und einer unbekannten Probe inkubiert. Danach werden die gebundenen und die ungebundenen Toxinanteile voneinander abgetrennt und die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen mit einem Szintilla-

tionszähler bestimmt. Die Ermittlung der Toxinkonzentration der Probe erfolgt mit Hilfe einer Standardkurve, in der das Verhältnis von gebundener (B) zu ungebundener (F) Radioaktivität (B/F) gegen die logarithmische Konzentration des unmarkierten Toxinstandards aufgetragen ist. Es gibt verschiedene Methoden die gebundenen und ungebundenen Toxinfraktionen voneinander zu trennen. Die wichtigsten sind: a) die Ammoniumsulfat-Präzipitation b) die doppelte Antikörpertechnik c) die Festphasen-RIA-Methode d) die Dextran beschichtete Tierkohlesäule und e) die Albumin-beschichtete Tierkohle (CHU, 1986). Das Probenmaterial benötigt im allgemeinen nur einen einfachen Extraktionsschritt. Dabei lassen sich mit einer anschließenden Sep-Pak-Behandlung die Untersuchungsergebnisse verbessern.

Die bisherigen Berichte über die Erstellung von RIA für Trichothecene sind sehr spärlich.

LEE und CHU (1981 a) entwickelten ein radioimmunometrisches Verfahren zum Nachweis von T2-Toxin.

Sie koppelten bovines Serumalbumin (BSA) an T2-Toxin-Hemisuccinat (T2-HS) und immunisierten damit Kaninchen.

Mit dem gewonnenen Antiserum (Verdünnung 1:10, 50 µl/Kavität) inkubierten sie eine Serienverdünnung des unmarkierten T2-Toxins (100 µl/Kavität) bzw. einer unbekannten Probe (100 µl/Kavität) zusammen mit ^3H -T2-Toxin (50 µl/Kavität) zunächst eine halbe Stunde bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 6 °C. Nach der Inkubationszeit wurde die Mischung mit 0,3 ml 67%-iger $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung präzipitiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das Präzipitat in 0,5 ml 40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gelöst um erneut gefällt zu werden. Der Rückstand wurde in 1 ml Aqua dest. gelöst. Die Radioaktivität der beiden vereinigten Überstände und des Präzipitates wurden anschließend mit einem Szintillationszähler bestimmt. Die Toxinkonzentration der Probe wurde mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt (siehe oben). Die Nachweisgrenze lag in Weizenproben bei 1 ppb T2-Toxin und in Maisproben bei 2,5 ppb. Die Wiederfindungsrate für Weizen- und Maisproben betrugen 84 % und 103 %.

In Körperflüssigkeiten lagen die Nachweisgrenzen bei 0,5 ppb im Serum bzw. bei 2,5 ppb in Urin und Milch. Bei 0,5 - 2,0 ppb Toxinzusatz konnten in Serum und Milch 87 - 106 % wiedergefunden werden. In mit 2,5 - 20 ppb gespicktem Harn konnten 88 - 117 % des Toxins nachgewiesen werden (LEE und CHU, 1981 b).

Ein weiteres RIA-Verfahren wurde von FONTELLO et al. (1983) erarbeitet.

2.9.3.3 Enzymimmunologische Verfahren (EIA)

Allgemeines:

Obwohl der RIA die endokrinologische Forschung revolutionierte und Ausgangspunkt für andere immunologische Techniken war, ist seine Anwendung wegen des Gebrauches von Radioisotopen doch sehr problematisch. Durch die Entwicklung nicht isotopischer, insbesondere enzymmarkierten Antikörper und Antigene konnte dieser Nachteil beseitigt werden (ENGVALD und PERLMAN, 1971; VAN WEEMEN und SCHUURS, 1971).

Der EIA (enzyme immunoassay) basiert auf der Konkurrenz einer zu bestimmenden Unbekannten mit der gleichen, aber enzymmarkierten Substanz um die Bindung an den gemeinsamen Reaktionspartner im Untersuchungssystem. Eine Quantifizierung dieses Reaktionsablaufes erfolgt mittels einer enzymatischen Farbreaktion, die photometrisch gemessen wird.

Analog zum RIA gibt es auch für den ELISA verschiedene Testprinzipien (OELLERICH, 1984).

Homogene Verfahren:

Dieses als EMIT (Enzyme multiplied immunoassay technique) bezeichnete Prinzip benötigt keine Trennung von gebundenen und

ungebundenen Reaktionspartnern. Es wird hauptsächlich zum Nachweis von Haptenen verwendet.

Heterogene Verfahren:

Nachweissysteme, bei denen die Enzymaktivität des Konjugates nicht durch die Antigen-Antikörper-Reaktion beeinflusst wird, benötigen einen Trennungsschritt und werden daher als heterogen bezeichnet.

Beim ELISA wird dazu meistens eine Festkörperphase (solid phase) verwendet, die durch die Bindung eines Immunosorbens (Antigen oder Antikörper) an bestimmte Materialien (Polystyrol, Zellulose oder magnetische Polyacrylamid-Agarose-Teilchen) entsteht.

Diese Verfahren erlauben die Bestimmung von Antigenen, Haptenen und Antikörpern.

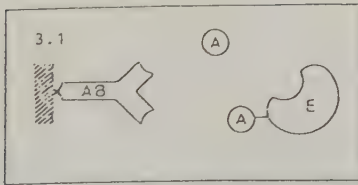
Die heterogenen Techniken lassen sich in drei Gruppen einteilen (Abb.3):

- Kompetitiver ELISA (Abb.3.1)

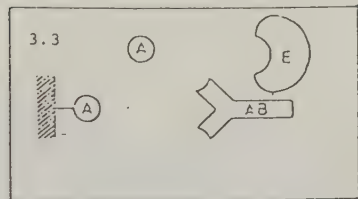
Das markierte und unmarkierte Antigen konkurrieren um die gemeinsame Bindungsstelle der limitierten Antikörper entweder gleichzeitig (simultan) oder nacheinander (sequential saturation, konsekutiv).

Das letztgenannte Prinzip wird hauptsächlich in der Endokrinologie angewendet, wenn Haptene (Hormone) in besonders niedriger Konzentration im Serum bestimmt werden sollen. Die Verwendung des simultanen ELISA erspart zwar einen Arbeitsgang, doch ist damit meistens ein Empfindlichkeitsverlust des Testsystems verbunden. Der direkte Kontakt von Antigen-Enzym-Konjugat und Probenmaterial kann nämlich zu einer Beeinflussung der Enzymaktivität führen. Außerdem wird das Probenmaterial durch die Zugabe der Antigen-Enzym-Konjugat-Lösung stark verdünnt. Der Empfindlichkeitsverlust basiert aber auch darauf, daß die Assoziationskonstante für die Bildung des Antigen Antikörper-Komplexes größer

Kompetitiver ELISA



Immunoenzymometrischer ELISA



DASP-ELISA

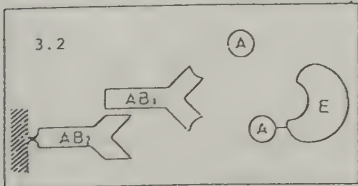


Abbildung 3: Prinzipien des heterogenen Enzym-Immunoassay (ELISA)
(nach OELLERICH, 1984)

Erklärung im Text

A: Antigen E-A: Enzym-markiertes Antigen E-AB: Enzym-markierte Antikörper AB und AB₁: Antikörper gegen das zu testende Hapten oder Antigen AB₂: Antikörper gegen das Immunglobulin der Spezies, die gegen das zu bestimmende Antigen immunisiert wurde.

ist als die Dissoziationskonstante. Durch die getrennte Zugabe von markiertem und unmarkiertem Antigen können sich diese beiden Komponenten unbeeinflusst von einander an das Immunosorbens anlagern und somit die Nachweisgrenze herabsetzen (MÄRTLBAUER, 1985).

Es lassen sich zwei unterschiedliche Verfahren unterscheiden:

a) Direkter ELISA: (Abb.4)

Spezifische Antikörper werden an eine Festkörperphase adsorbiert (I) und anschließend wird unmarkiertes Antigen in der Probe oder als Standard dazugegeben (II). Dabei werden proportional zur Antigenkonzentration die Antikörperbindungsstellen besetzt. Die restlichen freien Bindungsstellen werden anschließend durch enzymmarkiertes Antigen belegt (III). Die Menge des gebundenen markierten Antigens wird photometrisch anhand des Substratumsatzes gemessen (IV) und ist umgekehrt proportional zur Menge des freien Antigens.

b) Indirekter ELISA: (Abb.4)

Hier wird zuerst das Antigen an die Festkörperphase adsorbiert (I). Die spezifischen Antikörper werden mit dem Antigenstandard oder der Probe inkubiert (II) und anschließend binden sich die noch freien Antikörper an das adsorbierte Antigen (III). Nach einem Waschschrift wird ein zweiter enzymmarkierter Antikörper (IV), der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist zugegeben. Nach Substratzugabe kann damit die Menge des gegen das Antigen in der Festkörperphase gerichteten Antikörpers und damit indirekt die Menge des Antigens in der Probe bzw. im Standard bestimmt werden.

Die direkten Verfahren benötigen einen Arbeitsschritt weniger und eignen sich gut zur schnellen Antigenbestimmung. Ist es jedoch nicht möglich ein stabiles enzymmarkiertes Antigen herzustellen, so läßt sich dieses Problem durch die Anwendung eines indirekten ELISA vermeiden.

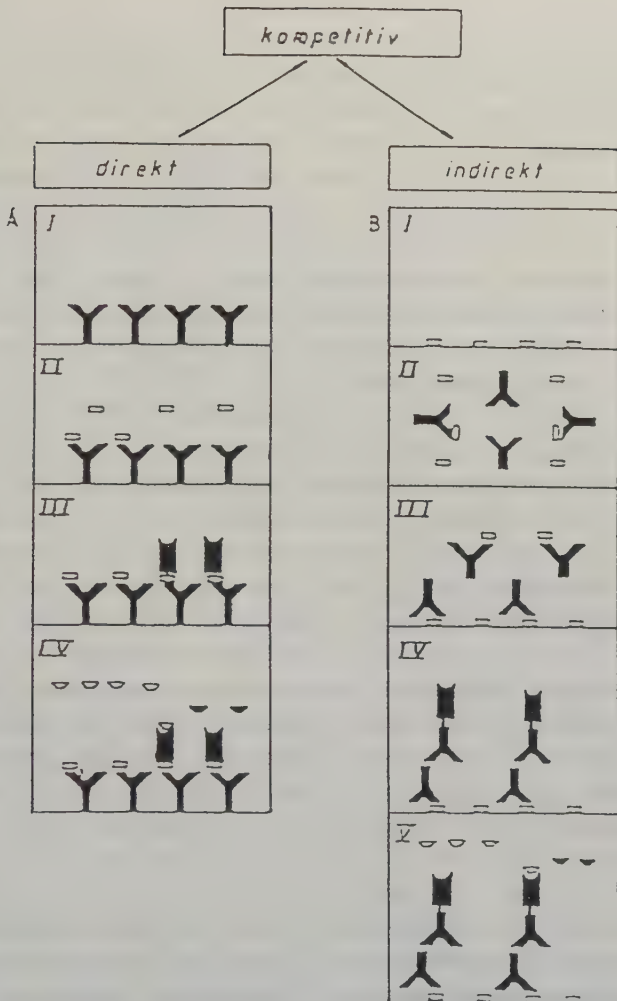
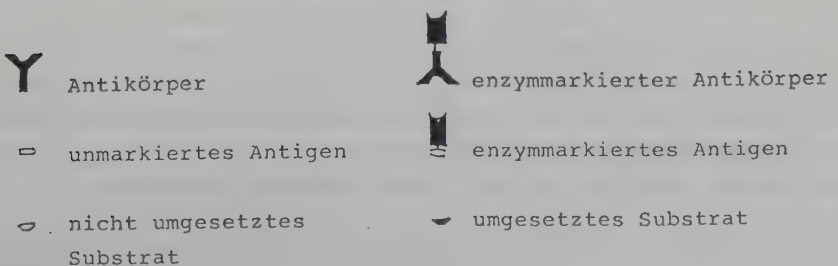


Abbildung 4: Prinzipien des kompetitiven ELISA
(nach MÄRTLBAUER, 1985)



Bei der Double-Antibody-Solid-Phase (DASP)-Technik (Abb.3.2) werden zwei gegeneinander gerichtete Antikörper, die von verschiedenen Tierspezies stammen, eingesetzt. Der Immunkomplex aus enzymmarkiertem und antigenspezifischem Antikörper wird durch den zweiten Antikörper präzipitiert und an die Festkörperphase gebunden.

Es gibt homologe und heterologe ELISA-Verfahren. Wenn zur Kopplung an das Trägerprotein oder das Enzym dasselbe Toxinderivat verwendet wurde, spricht man von einem homologen, anderenfalls von einem heterologen Ansatz.

Bei der Immunisierung von Tieren mit Hapten-Protein-Konjugaten entstehen nicht nur Antikörper gegen das Hapten selbst, sondern auch gegen das Trägerprotein und dessen Bindungsstellen mit dem Hapten. Dies führt u. a. dazu, daß das eigentliche Hapten von den Antikörpern schlechter erkannt wird als die derivatisierte Substanz, die zur Bindung an das Trägerprotein verwendet wurde.

Beim homologen ELISA wird zum Nachweis eines bestimmten Haptens (z. B. T2-Toxin) ein strukturgleiches Hapten im Enzym-Konjugat eingesetzt (z. B. T2-HS-HRP). Dies kann zu einer erhöhten Nachweisgrenze für das Hapten führen, da das Enzym-Konjugat stärker gebunden wird und vom Immunosorbens nur schwer verdrängt werden kann.

Dieser Nachteil wird beim heterologen ELISA weitestgehend vermieden, indem zur Kopplung an das Enzym ein Hapten verwendet wird, das sich mindestens in einer funktionellen Gruppe mit dem zur Immunisierung verwendeten Hapten unterscheidet. So wird z. B. zum Nachweis von T2-Toxin ein HT2-HS-HRP-Konjugat benützt.

- Immunoenzymometrischer ELISA (Abb.3.3)

Das gesuchte Antigen wird an im Überschuß vorliegende markierte Antikörper gebunden. Die verbleibenden freien markierten Antikörper werden durch die an die Festkörperphase gebundenen, ebenfalls

im Überschuß vorliegenden Antigene abgetrennt und nach einem Waschschrift die Enzymaktivität bestimmt.

2.9.3.4 Enzymimmunologischer Nachweis von Trichothecenen

PESTKA et al. (1981) entwickelten einen kompetitiven ELISA für T2-Toxin. Dazu immunisierten sie Kaninchen mit einem nach der Methode von CHU et al. (1979) hergestelltem T2-HS-BSA (300 µg/kg KGW) und entbluteten die Tiere nach einigen Wochen.

Mit BSA und Glutaraldehyd vorbehandelte Platten wurden mit Antiserum (50 µl/Kavität) in einer Verdünnung von 1:400 beschichtet und luftgetrocknet. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, wurden die Platten nach einem Waschschrift mit PBS, das 1 % BSA enthielt, abgesättigt. T2-Toxin-Standard und Proben (50 µl/Kavität) wurden eine Stunde bei 37 °C miteinander inkubiert. Anschließend wurde T2-HS-HRP-Konjugat (50 µl/Kavität) dazugegeben und nach einer Stunde die Enzymaktivität mit ABTS (2,2'-azino-di-3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonat)-H₂O₂-Substrat bestimmt. Die Reaktion wurde photometrisch bei 414 nm gemessen. Die Nachweisgrenze lag bei 2,5 pg/Ansatz bzw. 100 pg/ml.

PETERS et al. (1982) banden T2-HS an mit Poly-(D-lysin) beschichtete Polystyrolplatten. Kaninchenserum gegen T2-Toxin wurde dazugegeben und die Bindung des ersten Antikörpers durch Zugabe von freiem Toxin und Anti-Kaninchen-Immunglobulin-Peroxidase Konjugat nachgewiesen. Nach Umsetzung des Substrates ABTS-H₂O₂ wurde die Reaktion photometrisch bestimmt. Die Anwesenheit von freiem T2-Toxin während des ersten Inkubationsschrittes führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Absorption. Die Nachweisgrenze lag bei 2 pg/Ansatz bzw. 100 pg/ml.

Die Testung der Spezifität der Antikörper gegen T2-HS, T2-Toxin, HT2-Toxin und DAS ergab eine molare Reaktivität bezogen auf T2-Toxin von 2; 1; 0,125 und < 0,001.

FAN et al.(1984) wiesen mittels indirektem ELISA T2-Toxin in Körperflüssigkeiten nach. Sie beschichteten mit Polylysin vorbehandelte Platten mit Kaninchen-Anti-T2-Toxin-Antiserum und gaben anschließend Probenextrakte zu. Die Menge der an die Platte gebundenen T2-Toxin-Antikörper bestimmten sie mit Hilfe eines Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugates. Die Nachweisgrenze lag bei 200 pg/ml Milch oder Urin. Die Wiederfindungsrate in den gereinigten Serum, Urin und Milchproben lag bei 51 - 82 %, 73 - 82 % bzw. 80 - 83 %.

GENDLOFF et al.(1984) untersuchten mit *Fusarium sporotrichoides* infizierte Maisproben mit einem ELISA auf T2-Toxin. Sie modifizierten dabei lediglich den von PESTKA et al.(1981) entwickelten Test.

ESGIN (1987) untersuchte Lebens- und Futtermittel mit einem von ihm beschriebenen ELISA ebenfalls auf T2-Toxin.

Gegen DAS wurden bisher zwei verschiedene Antikörper mit Hilfe des RIA charakterisiert, aber noch kein immunologisches Nachweisverfahren beschrieben.

So immunisierten CHU et al.(1984) Kaninchen mit an BSA gekoppeltem DAS-HS bzw. Hemiglutarat(HG) (500-600 µg/kg KGW), wobei DAS-HG bessere immunogene Eigenschaften besaß. Die höchsten Antikörpertiter (> 1:1000) wurden erst nach mehrmaligen Restimulierungsimpfungen mit DAS-HG-BSA (250 µg/ kg KGW) erreicht.

Die mit DAS-HG-BSA erzeugten Antikörper zeigten im RIA eine hohe Spezifität für DAS. Die Toxinkonzentrationen, die zu einer 50 %igen Hemmung der Bindung des radioaktiven DAS an die Antikörper führten, betrugen für unmarkiertes DAS 15 ng/ml, für 4-Monoacetoxyscirpenol (4-MAS) 1300 ng/ml und für 15-MAS 3000 ng/ml.

ZHANG et al.(1986 a) modifizierten die vorhergehend beschriebene Methode. Sie konjugierten O-Carboxymethyloxim (CMO) an BSA. Erst 15 Wochen nach der Grundimmunisierung und zwei Restimulierungen konnten Antikörpertiter von 1:800 erhalten werden.

Die Charakterisierung der Antikörper erfolgte mit der oben genannten Methode und ergab für eine 50 %ige Hemmung der Bindung von radioaktivem DAS an die Antikörper für unmarkierte Trichothecene folgende Werte: DAS 42 ng/ml, 4-MAS 160 ng/ml, 15-MAS 200 ng/ml, Acetyl-Deoxynivalenol 3200ng/ml, T2-Toxin 4500 ng/ml, Acetyl-T2-Toxin 6200 ng/ml und Neosolaniol 11200 ng/ml. Im Vergleich zu Antiseren von mit DAS-HG-BSA immunisierten Kaninchen hatte das Anti-DAS-CMO-BSA-Serum bedeutend höhere Kreuzreaktionen zu den anderen Trichothecenen.

ZHANG et al.(1986 b) und WEI et al.(1986) gewannen Antikörper gegen Deoxynivalenol-Triacetat bzw. 3'-OH-T2-Toxin.

Auch gegen Deoxyverrucarol existieren bereits Antikörper (CHU et al., 1984 b).

HUNTER et al.(1985) gelang die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen T2-Toxin.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Herstellung des DAS-Enzymkonjugates

3.1.1 Material

Folgende Reagenzien und Geräte wurden zur Enzymmarkierung von DAS verwendet:

- Diacetoxyseirpenol (DAS) (Sigma, D 0761)
- Pyridin (Sigma, P 3776)
- Bernsteinsäureanhydrid (Sigma, S 7626)
- Meerrettich-Peroxidase Typ VI (HRP) (Sigma, P 8375)
- n-Hydroxysuccinimid (Sigma, H 7377)
- Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (Sigma, D 3128)
- N,N-Dimethylformamid (DMF) (Sigma, D 4254)

Sofern die verwendeten Reagenzien nicht gesondert aufgeführt sind, wurden sie von der Firma Merck, Darmstadt bezogen und hatten p.a.-Qualität.

- Silica-Gel-Dünnschichtchromatographie-Platten (Sigma, T 6895) ohne Fluoreszenzindikator
- Magnetprüher Heidolph MR 2002
- Membranfilter (Millipore, Porendurchmesser 0,22 μ m)
- Gefriertrocknungsgerät, Leybold-Heraeus GT-2
- UV-Lampe: MIN UVIS, (Desaga)
- Rotationsverdampfer, (Büchi)
- UV-Monitor UA 5 (ISCO)
- Fraktionensammler (ISCO, Modell 328)
- Sephadex-G 50 (Pharmacia) zur Gelfiltration
- Photometer PCP 6121 (Eppendorf)
- Variopipetten: 0,5 - 10 μ l; 10 - 100 μ l; 100 - 1000 μ l (Eppendorf)
- 12-Kanalpipette (Flow Laboratories)

3.1.2 Methodik

3.1.2.1 Derivatisierung von DAS zu DAS-Hemisuccinat (DAS-HS)

Die Einführung einer zur Kopplung an HRP befähigten Gruppe in das DAS-Molekül erfolgte in Anlehnung an die Methode von CHU et al. (1984): 25 mg DAS wurden in 0,5 ml Pyridin gelöst und mit 300 mg Bernsteinsäureanhydrid 6 Stunden lang im Dampftopf erhitzt. Nach 4 h wurde zur Überprüfung der Umsetzung eine Probe entnommen und diese dünnschichtchromatographisch untersucht (siehe 3.1.2.2). Das schwarzbraune Reaktionsgemisch wurde anschließend in 15 ml Chloroform aufgenommen, in einen Scheidetrichter überführt und dreimal jeweils 15 min mit 35 ml aqua dest. gewaschen. Die Chloroformphase wurde im Rotationsverdampfer bei 37 °C bis zur Trockne eingengt, der Rückstand in 1 ml MeOH gelöst und die vollständige Umsetzung des DAS zu DAS-HS dünnschichtchromatographisch kontrolliert. Das DAS-HS wurde anschließend in kleinen Portionen lyophilisiert und bei - 20 °C aufbewahrt.

3.1.2.2 Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Umsetzung

Die Verlaufskontrolle der unter 3.1.2.1 beschriebenen Reaktion erfolgte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Eine Silica-Gel-Dünnschichtplatte (ohne Fluoreszenzindikator) wurde bei 110 °C 15 min lang im Sterilisator aktiviert, daraufhin mit 3%iger Oxalsäure vorbehandelt und luftgetrocknet. Auf die vorbehandelte Platte wurde 1 µl des DAS-HS-Probengemisches und 10 µl einer methanolischen DAS-Standardlösung (1 mg/ml) als Referenzsubstanz aufgetragen und in Toluol/Ethylacetat (3+1) chromatographiert. Danach wurde die Platte luftgetrocknet, zur Probenderivatisierung mit 30 % H₂SO₄ besprüht und bei 130 °C 10 min getrocknet. Die Derivatisierungsprodukte zeigten bei 360 nm eine bläuliche Fluoreszenz.

3.1.2.3 Kopplung von HRP an DAS-HS

Die Kopplung von HRP an DAS-HS erfolgte mit einer von ANDERSON et al. (1964) beschriebenen Estermethode. Diese Reaktion muß unter Lichtabschluß im wasserfreiem Milieu stattfinden.

4,16 mg (8,77 μmol) DAS-HS wurden in 400 μl DMF gelöst. Dazu wurden 12 mg (58,1 μmol) Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) und 2,8 mg (28,2 μmol) N-Hydroxysuccinimid gegeben und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Diese Lösung wurde dann tropfenweise zu 25 mg (0,625 μmol) HRP (gelöst in 2 ml 0,13 Mol/l NaHCO_3) gegeben. Der Reaktionsansatz wurde unter ständigem Rühren über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Abb.5 zeigt den chemischen Reaktionsablauf bei der Herstellung von enzymmarkiertem DAS-HS.

3.1.2.4 Reinigung des Kopplungsproduktes

Um das DAS-HS-HRP-Konjugat von Schwebeteilchen zu befreien, wurde es bei 3000 U/min und 4 °C 20 min zentrifugiert und anschließend über einen Millipore Membranfilter gereinigt. Die niedermolekularen, ungebundenen Reaktionspartner wurden anschließend durch eine gelchromatographische Reinigung abgetrennt. Dazu wurde das Kopplungsprodukt auf eine mit PBS, äquilibrierte Sephadex G-50 Säule (75 x 2,5 cm) aufgetragen und mit PBS eluiert.

Das so aufbereitete DAS-HS-HRP wurde portionsweise lyophilisiert und tiefgefroren.

Die Bestimmung des Peroxidasegehaltes wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) durchgeführt.

Die Kopplungsrate konnte wegen des Fehlens von UV-Absorptionseigenschaften des DAS und DAS-HS nicht ermittelt werden.

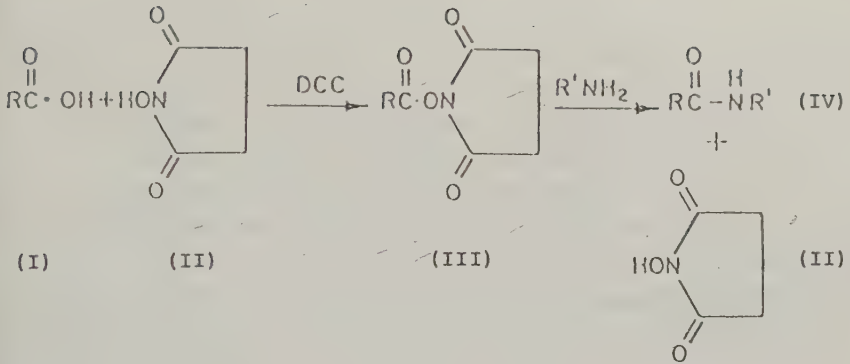


Abbildung 5: Reaktionsablauf bei der Herstellung von DAS-HS-HRP
(nach ERLANGER, 1980)

DAS-HS (I) bildet mit n-Hydroxysuccinimid (II) unter Beteiligung des Katalysators DCC einen aktivierten Ester (III). Das Enzym Peroxidase ($\text{R}'\text{NH}_2$) lagert sich unter Ausbildung einer Peptidbindung an den Ester an, wobei das DAS-HS-Peroxidase-Konjugat (IV) und freies n-Hydroxysuccinimid (II) entstehen.

3.1.2.5 Ergebnisse

Die Überprüfung des Reaktionsablaufes mittels DC ergab, daß nach 6 h eine fast vollständige Umsetzung zu DAS-HS stattfand. Das untersuchte Kopplungsprodukt wies auf der DC-Platte nur einen klar abgegrenzten Punkt auf (r_F -Wert 0,66) und unterschied sich somit deutlich vom DAS-Standard, der einen r_F -Wert von 0,52 besaß. Das nach nur vierstündiger Reaktionszeit untersuchte Gemisch zeigte dagegen noch zwei große Punkte, die dem DAS-HS und DAS entsprachen (Abb.6). Die Proteinbestimmung ergab einen Gehalt von 1,021 mg HRP/ml.

3.2 Herstellung eines immunogen wirksamen DAS-Konjugates

3.2.1 Material

Es wurden folgende Reagentien und Lösungen verwendet:

- Humanes Serumalbumin (HSA) (Sigma, A 3782)
- 1-Ethyl-3-(3-diaminopropyl)-carbodiimid (EDPC) (Sigma, E 6383)
- Glutarsäureanhydrid (Sigma, G 8136)
- Phosphatpuffer (PBS) pH 7,2 mit der Zusammensetzung:
 - 0,116 Mol/l NaCl
 - 0,010 Mol/l Na_2HPO_4
 - 0,003 Mol/l KH_2PO_4

Zur Herstellung des DAS-Hemiglutarates (DAS-HG) wurden außerdem die unter 3.1.1 beschriebenen Materialien benötigt.

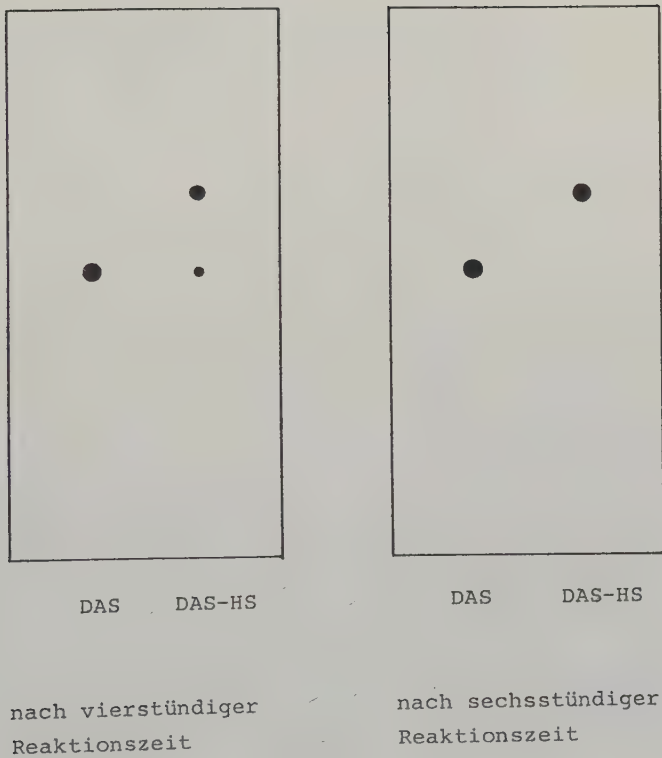


Abbildung 6: Darstellung der dünnschichtchromatographischen Überprüfung der Umsetzung von DAS zu DAS-HS.

3.2.2 Methodik

3.2.2.1 Herstellung eines zur Kopplung befähigten DAS-HG

Die Herstellung erfolgte nach der unter 3.1.2.1 bis 3.1.2.4 angegebenen Weise, nur daß anstelle von Bernsteinsäureanhydrid nun Glutarsäureanhydrid verwendet wurde. Im Gegensatz zum schwarzbraunen HS ist das HG farblos und erschwert damit eine visuelle Verlaufskontrolle.

3.2.2.2 Kopplung von DAS-HG an HSA

Zur Kopplung wurde die von CHU et al. (1979) für T2-Toxin-HS beschriebene Carbodiimidmethode angewandt.

Ca. 10 mg DAS-HG (siehe 3.2.2.1) wurden im 2 ml Methanol (MeOH) gelöst, tropfenweise mit 200 mg EDPC in 4 ml aqua dest. vermischt und 10 min lang bei Raumtemperatur gerührt. Diese Lösung wurde anschließend langsam zu 10 mg HSA in 4 ml aqua dest. gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das weiß-graue Reaktionsgemisch wurde dann 3 d lang gegen 3 x 5 l PBS dialysiert und anschließend portionsweise gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde dann bei - 20 °C aufbewahrt.

Die Bestimmung des HSA-Gehaltes erfolgte nach Lowry et al. (1951).

Abb.7 stellt das Schema der Reaktionsabläufe bei der Herstellung von DAS-HG-HSA dar.

3.2.2.3 Kopplung von DAS-HS an HSA

Die Kopplung erfolgte analog nach der in 3.2.2.2 beschriebenen Methode.



DAS-HG (I) reagiert mit EDPC (II) unter Bildung eines sauerstoffacylierten Harnstoffes (III). Die weitere Umsetzung kann auf zwei verschiedenen Wegen ablaufen. a) Die erwünschte Umsetzungsart wird durch H^+ katalysiert, wobei ein protonierter sauerstoffacylierter Harnstoff (IV) entsteht, der sich in einer schnell ablaufenden Reaktion mit HSA (V) zu einem Amid (VI) und einem dialkyliertem Harnstoff (VII) verbindet. b) Der zweite Weg läuft sehr viel langsamer ab, wobei zuerst ein acylierter Harnstoff (VIII) gebildet wird, der sich mit HSA zu den Verbindungen (VI) und (VII) umsetzt.

3.2.2.4 Ergebnisse

Die Herstellung des DAS-HG verlief ebenso problemlos wie die des Hemisuccinates. Bei der dünn-schichtchromatographischen Überprüfung ergab sich nach sechs-stündiger Reaktionszeit eine vollständige Umsetzung zu DAS-HG (r_F -Wert: 0,70).

Die Proteinbestimmung ergab für das DAS-HG-HSA eine Konzentration von 384 μg HSA/ml und für das DAS-HS-HSA von 400 μg HSA/ml.

3.3 Immunisierungsversuche

3.3.1 Material

Als Versuchstiere wurden "Pasteurella-negative", ca. vier Monate alte Kaninchen der Rasse "Deutsche Riesenschecke" verwendet. Als Futtermittel wurde eine "Altromin"-Standarddiät und Wasser ad libitum verabreicht.

Es wurden folgende Reagenzien und Geräte verwendet:

- Steriles pyrogenfreies Aqua ad iniectabilia (Fresenius)
- komplettes Freund'sches Adjuvans (Sigma, F 5881)
- inkomplettes Freund'sches Adjuvans (Sigma, F 5506)
- Fetales Kälberserum (FCS) (Sigma, F 4315)
- Polyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20) (Sigma, P 1379)
- o-Phenylendiamin (OPD) (Sigma, P 9029)
- Taumelgerät Reax 3 (Heidolph)
- Die Microelisaplaten "Immuno Plate I 96 F" (Nunc) wurden mit einem Elisa-Autoreader Typ MR 580 der Firma Dynatech (Denkendorf) ausgewertet.

Die in der Arbeit wiederholt eingesetzten Puffer sowie die Waschlösung hatten die unten beschriebene Zusammensetzung, wobei die Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt mit der Qualitätsstufe p.a. bezogen wurden:

- Phosphatpuffer (PBS) siehe 3.2.1
- Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 9,6
 - Na_2CO_3 Mol/l
 - NaHCO_3 Mol/l
- Substratpuffer pH 5,0
 - $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1 Mol/l
 - NaOH 0,2 Mol/l
- Substratlösung
 - 0,0149 Mol/l OPD
 - 570 μmol 30 % H_2O_2 pro 1l Substratpuffer
- Waschlösung
 - NaCl 0,14 Mol/l
 - 0,025 % Tween 20

3.3.2 Methodik

3.3.2.1 Immunisierung von Kaninchen

Um die antigenen Eigenschaften der beiden nach 3.2 hergestellten DAS-Konjugate zu testen, wurden zwei Kanichen mit DAS-HS-HSA und drei mit DAS-HG-HSA nach der Methode von NIESCHLAG et al. (1975) immunisiert.

190 μg Toxin-Protein-Konjugat wurden mit 0,5 ml Aqua ad iniectabilia und 1,5 ml komplettem Freund'schem Adjuvans intensiv vermischt. Das komplette Freund'sche Adjuvans, dem inaktiviertes Mycobacterium tuberculosis zugesetzt ist, dient zur Stimulierung des Immunsystems.

Die dabei entstandene Emulsion wurden den Tieren intrakutan beiderseits des geschorenen und desinfizierten Rückens, gleichmäßig auf etwa 20 Injektionsstellen verteilt, verabreicht.

Nach 10, 16 und 21 Wochen wurden Restimulierungen mit der gleichen Toxinmenge (190 µg/Tier) und inkomplettem Freund'schen Adjuvans durchgeführt.

Um die Antikörperproduktion zu verfolgen, wurden erstmals vier Wochen nach der Erstimmunisierung und darauf im zweiwöchigem Abstand jedem Tier jeweils 10 ml Blut aus der Ohrarterie entnommen und mit dem ELISA untersucht (siehe 3.3.5).

Da sich auch nach der dritten Restimulierung bei den mit DAS-HS-HSA behandelten Tieren keine spezifischen Antikörper nachweisen ließen, wurden die Versuche nur noch mit den DAS-HG-HSA stimulierten Kaninchen weitergeführt.

Um für weitere Arbeiten genügend Antiserum zur Verfügung zu haben, wurden deshalb 3 weitere Tiere mit dem DAS-HG-HSA in oben beschriebener Weise immunisiert.

Nach Erreichen eines genügend hohen Antikörpertiters wurden die Tiere narkotisiert und durch Herzpunktion entblutet.

3.3.2.2 Serenaufbereitung

Das Nativblut wurde zur Gerinnung 2 h im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend erfolgte 20minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 3000 U/min. Die Ausfällung der Immunglobuline erfolgte nach der Methode von HEBERT et al. (1973). 1 ml Serum wurde mit 1 ml 70 %iger gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung 4 h bei Raumtemperatur inkubiert und dann 20 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das weiße Präzipitat in PBS gelöst und auf das Ausgangsvolumen gebracht. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, wobei der Inkubationsschritt nach der Ammoniumsulfat-Zugabe auf 5 min verkürzt wurde.

Die Seren wurden anschließend solange gegen PBS dialysiert, bis das Außendialysat sulfatfrei war. Die Kontrolle erfolgte mit einer gesättigten BaCl₂-Lösung unter Ansäuerung mit 5 Mol/l HCl. Die so gewonnenen Antiseren wurden portioniert und bei - 20 °C eingefroren.

3.3.2.3 Nachweis spezifischer Antikörper mittels ELISA

Zur Kontrolle des Immunisierungsverlaufes wurde der Antikörpergehalt des Serums mittels direktem ELISA bestimmt. Um diesen Nachweis führen zu können, mußten zuerst die Reaktionspartner aufeinander abgestimmt werden.

Dazu wurden Microelisa-Platten im Sechsfachansatz mit in Carbonat-Bicarbonatpuffer angelegten Antiserumverdünnungsreihen (100 µl/Kavität) beschichtet und 3 h bei 37 °C inkubiert. Als Ausgangspunkt wurde eine Serumverdünnung von 1:10 verwendet, die dann in den Platten in Dreier-Schritten weiterverdünnt wurden. Anschließend wurden die Platten zur Vermeidung unspezifischer Bindungen mit Phosphatpuffer(PBS) (150 µl/Kavität), der 3 % FCS (3 % FCS/PBS) enthielt, eine halbe Stunde abgesättigt. Alle, auch die im weiteren beschriebenen Inkubationsschritte erfolgten unter leichtem Taumeln bei Raumtemperatur. Die Platten wurden dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Anschließend wurden 100 µl von DAS-HS-HRP-Verdünnungsreihen, die in PBS, mit 2 % FCS-Zusatz (2% FCS/PBS) angelegt waren, pro Kavität pipettiert. Der FCS-Zusatz erwies sich bei früher am Institut entwickelten ELISA-Verfahren für Mykotoxine (Biermann, 1980 und Esgin, 1987) als besonders günstig und wurde deshalb auch für diesen Test übernommen. Nach einer einstündigen Inkubation wurde wiederum dreimal gewaschen, die Platten ausgeschlagen und OPD-H₂O₂-Substratlösung (100 µl/Kavität) zur Bestimmung der Enzymaktivität zugesetzt. Die Reaktion wurde mit 1,25 Mol/l H₂SO₄-Lösung nach ca. 10 min abgestoppt und die Extinktion mit einem ELISA-Autoreader bei 490 nm gemessen.

Als Titer wurde die höchste Serumverdünnung festgelegt, bei der die Substratumsetzung eine Extinktion von 0,3 Einheiten aufwies. Um auszuschließen, daß bereits vor der Immunisierung ein spezifischer Antikörperspiegel bestand, wurde von jedem Tier Serum, das vor der Stimulierung gewonnen wurde (Präimmunserum), als Nullwert mituntersucht.

3.3.2.4 Ergebnisse

Die zur Grundimmunisierung eingesetzten Toxin-Protein-Konjugatmengen (190 µg Protein/Tier) verursachten bei den Tieren eine leichte Störung des Allgemeinbefindens. An den Injektionsstellen entstanden nach 24 h leichte Rötungen und Schwellungen, die nach 5 d in etwa erbsengroße intrakutane Abszesse mit krustöser nässender Oberfläche übergingen. Die meisten Abszesse verheilten nach 4 Wochen komplikationslos. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die bisher verwendete Proteinmenge auch zur weiteren Versuchsdurchführung beibehalten. Die Restimulierungsimpfungen verursachten bei den Kaninchen keinerlei Veränderungen.

Die mit DAS-HS-HSA immunisierten Tiere zeigten trotz Restimulierung keine Immunantwort und wurden nach der 18. Woche mittels Herzpunktion entblutet. Die Seren wurden bei - 20 °C tiefgefroren aufbewahrt.

Bei den mit DAS-HG-HSA immunisierten Tieren waren bereits 4 Wochen nach der Grundimmunisierung Antikörper nachweisbar, deren Konzentration sich dann nicht mehr wesentlich steigern ließ.

Wie aus den Tab.9 und 10 hervorgeht, erreichte von allen immunisierten Tieren Kaninchen 6 nach 14 Wochen die höchsten Antikörpertiter. Nach der ersten Restimulierung stieg der Antikörperspiegel von 1:2430 auf 1:7290. Trotz einer erneuten Antigengabe konnte ein Absinken der Antikörperkonzentration nicht verhindert werden.

Um von Kaninchen 5, dessen Serum sich durch relativ hohe Antikörpertiter und Spezifität auszeichnete (siehe Tab.9 und Abb.10) möglichst viel Blut gewinnen zu können, wurde das Tier nicht getötet, sondern im wöchentlichen Abstand zur Ader gelassen. Da der Antikörperspiegel nach den ersten beiden Antigengaben konstant blieb, wurde auf häufige Restimulierungen verzichtet, um die Qualität des Antiserums nicht durch die immunsuppressive Wirkung des DAS zu gefährden. Erst in der 29. Woche wurde eine

Tabelle 9: DAS-Antikörpertiter bei den mit DAS-HG-HSA
immunisierten Kaninchen 3,4 und 5

Wochen nach der Immunisierung	Elisa-Titer		
	Kaninchen 3	Kaninchen 4	Kaninchen 5
0	negativ	negativ	negativ
2	negativ	negativ	negativ
4	1: 810	negativ	1: 810
6	1:2430	1: 810	1:2430
8	1:2430	1:2430	1:2430
10	1:2430 *	1: 810 *	1:2430 *
12	1:2430	1: 810	1:2430
14	1:2430	1: 810	1:2430
16	1:2430 *	1: 810 *	1:2430
18	1:2430	1: 810	1:2430
21	1:2430 *	1: 810 *	1:2430
23	1:2430	1: 810	-
25	1:2430	1: 810	1: 810
27	1:7290	1:2430	1:2430
29	1:2430	1: 810	1: 810 *
31	1:2430	1: 810	1:2430
33	-	-	-
35	1: 810	1: 270	1:2430
37	1: 810 +	1: 270 +	1:2430
39			1:2430
.			.
.			.
.			.
50			1:2430

* subkutane Restimulierungen

+ Entblutung mittels Herzpunktion

Tabelle 10: DAS-Antikörpertiter bei den mit DAS-HG-HSA
immunisierten Kaninchen 6,7, und 8

Wochen nach der Immunisierung	Elisa		
	Kaninchen 6	Kaninchen 7	Kaninchen 8
0	negativ	negativ	negativ
2	negativ	negativ	negativ
4	1:2430	1: 810	1:2430
6	1:2430	1: 810	1:2430
8	1:2430	1: 810	1: 810
10	1:2430 *	1: 810 *	1: 810 *
12	1:2430	1: 810	1: 810
14	1:7290	1:2430	1:2430
16	1:7290	1:2430	1:7290
18	1:7290 *	1:2430 *	1:2430 *
20	1:7290	1:2430	1:2430
22	-	-	-
24	1:2430	1: 810	1: 810
26	1:2430	1: 810	1: 810
28	1:2430	1: 810	1: 810
30	1:2430	1: 270	1: 810
32	-	-	-
34	1:2430	1: 810	1: 810
36	1:2430 +	1: 810 +	1: 810 +

* subkutane Restimulierungen

+ Entblutung mittels Herzpunktion

erneute Auffrischungsimpfung verabreicht, die für die weitere Versuchsdurchführung vollauf genügte.

Der Antikörpertiter blieb über 50 Wochen hinweg fast immer (zwei Ausnahmen) auf dem maximalen Niveau.

Im direkten ELISA wurden optimale Enzymkonjugatverdünnungen von 1:16000 für die Seren 1 bis 5 und von 1:8000 für die Seren 6 bis 8 ermittelt. Die maximalen Extinktionen betrugen bei diesen Verdünnungen 1,1 bis 1,3 Einheiten und lagen somit im optimalen Meßbereich des ELISA-Autoreaders.

Abb.8 zeigt typische Titrationskurven für das Serum 5. Daraus wird ersichtlich, daß bei hohen Enzymkonjugatkonzentrationen die gemessenen Extinktionswerte nicht wesentlich voneinander abweichen. Erst ab einer Verdünnung von 1:8000 ergibt sich ein deutlicher Unterschied im Kurvenverlauf. Ab einer Antiserumverdünnung von 1:21870 war kein Substratumsatz mehr meßbar.

3.4 Entwicklung eines simultanen kompetitiven ELISA zum Nachweis von DAS

3.4.1 Material

Zur Durchführung der nachfolgend beschriebenen Elisasyeme (auch 3.5) wurden folgende, außer den unter 3.3.1 aufgeführten Materialien benötigt:

- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) (Sigma, T2885)

Herstellung der TMB-Lösung:

252 mg TMB in 5ml Aceton und 45 ml MeOH lösen (=21 mMol/l)

- Peroxidase-Puffer pH 3,95

0,21 Mol/l Citronensäuremonohydrat

+ 200 ml 1 Mol/l KOH

+ 3,15 mMol/l H_2O_2

ad 1000 ml aqua dest.

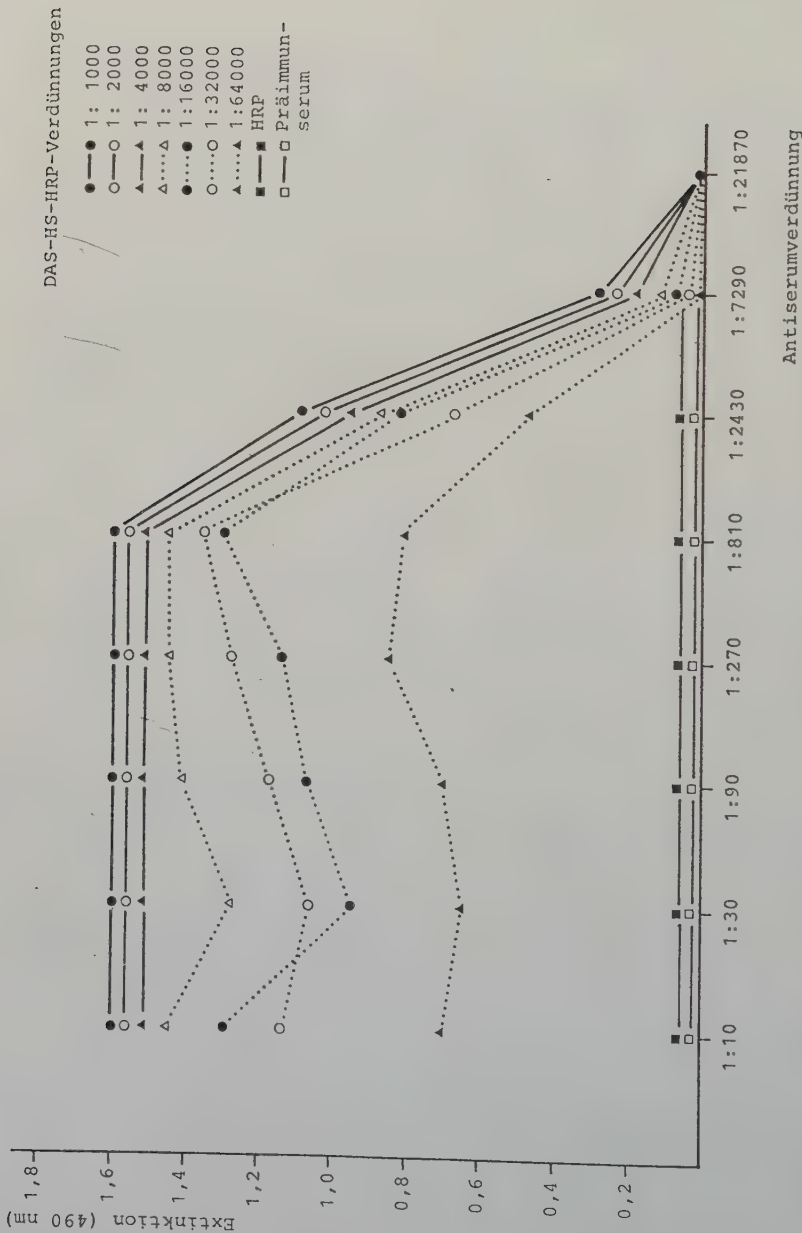


Abbildung 8: Titrationskurven der verschiedenen DAS-HS-HRP-Verdünnungen mit Antiserum 5

- Substratlösung

1 mMol/l TMB in Peroxidase-Puffer

Die photometrische Messung der Substratumsetzung erfolgt bei 450 nm.

Lichtgeschützt lassen sich die Reagentien bei 15 - 20 °C einige Wochen lang aufbewahren.

Die nachfolgenden Toxine wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) geliefert:

- 3 α - Acetyl-DAS (A 8410)
- DAS (D 0761)
- T2-Toxin (T 4887)
- 15-Monoacetoxyscirpenol (15-MAS) (A 8905)
- HT2-Toxin (T 4138)
- T2-Triol (T 4013)
- Verrucarol (V 1628)
- T2-Tetraol (T 3888)
- 3 α -Acetyl-Deoxynivalenol (Acetyl-DON) (D 3786)
- Deoxynivalenol (D 0156)
- Scirpentriol (SCT) (S 5762)

Neosolaniol und Nivalenol wurden von Wako Chemicals GmbH (Neuss) bezogen.

Alle anderen Reagenzien waren p.a. Qualität und stammten von der Firma E.Merck (Darmstadt).

3.4.2 Methodik

3.4.2.1 Versuche zur Abstimmung der Reaktionspartner

3.4.2.1.1 Auswahl des spezifischsten Antiserums

Die Qualität eines ELISA-Systems ist im hohen Maße von der Spezifität und dem Antikörpergehalt des verwendeten Antiserums abhängig. Von grundlegender Bedeutung für die Spezifität ist die Frage, inwieweit das freie Antigen - in diesem Falle Hapten - in

der Lage ist, sich an die Antikörper zu binden. Um dies zu prüfen, wurde ein direkter kompetitiver Elisa durchgeführt.

In den Vorversuchen nach 3.3.2.3 wurden für jedes Antiserum die geeignetsten Enzymkonjugat- und Antiserumverdünnungen ermittelt. Dabei ergaben sich folgende Verdünnungen, die im nachfolgenden Experiment verwendet wurden:

Antiserum	Konjugatverdünnung	Serumverdünnung
3	1:16000	1:2000
4	1:16000	1:1000
5	1:16000	1:2000
6	1:32000	1:1500
7	1: 8000	1: 500
8	1: 8000	1: 500

Die Microelisa-Platten wurden mit den verschiedenen Antiserumverdünnungen (in Carbonat-Bicarbonatpuffer, 100 μ l/Kavität) beschichtet und 3 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Nach 30minütiger Absättigung mit 3 % FCS/PBS (150 μ l/Kavität) wurde dreimal gewaschen. Anschließend wurde eine in 10 % Methanol/PBS angelegte Verdünnungsreihe (50 μ l/Kavität) ausgehend von 1 μ g DAS/ml und 50 μ l/Kavität enzymmarkiertes Toxin in der entsprechenden Verdünnung (in 2 % FCS/PBS) dazugegeben. Nach 1 h wurde erneut gewaschen, TMB-Substratlösung zugegeben (100 μ l/Kavität) und die Reaktion nach etwa 10 min mit 1 Mol/l H_2SO_4 (100 μ l/Kavität) abgestoppt. Die Extinktionen wurden bei 450 nm gemessen.

Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurden die Meßwerte prozentual auf eine toxinfreie Nullprobe bezogen, bei der eine freie ungehinderte Bindung des Enzym-Konjugates an das Immunosorbens und damit maximale Extinktion auftritt.

Mit den so ermittelten Werte wurden in ein Diagramm erstellt, wobei die logarithmierte Toxinkonzentration auf der Abszisse und die Extinktion auf der Ordinate aufgetragen wurden.

Mittels ELISA wurde getestet ob die gewonnenen Antiseren in der Lage waren, neben DAS auch die als Zwischenprodukte bei der Kopplung dienenden DAS-HS und DAS-HG zu binden.

Dazu wurden Platten mit den verschiedenen Antiseren in Verdünnungen von 1:810 beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absättigung erfolgte wie oben mit 3% FCS/PBS. Nach dreimaligem Waschen wurden 50 μ l/Kavität DAS-HS-HRP (1:16000 in 2 % FCS/PBS) und 50 μ l/Kavität von in 10 %igem Methanol/PBS (10 % MeOH/PBS) angelegten Verdünnungsreihen der obengenannten Stoffe zugegeben. Als Ausgangskonzentrationen dienten jeweils 1 μ g/ml, die dann in Dreier-Schritten weiterverdünnt wurden. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut gewaschen und die gebundene Enzymaktivität mit OPD-Substrat bestimmt.

3.4.2.1.2 Ermittlung der geeigneten Antiserum- und Enzymkonjugatverdünnung

Ziel der durchgeführten Versuchsreihen war es, die höchste Antiserum- und Enzymkonjugatverdünnung zu bestimmen, bei der das ELISA-System maximale Extinktionswerte von 0,8-1,0, bei möglichst geringen Standardabweichungen und empfindlichen Nachweisgrenzen für DAS aufwies.

Da DAS in Konzentrationen von 203 fg bis 1,3 ng/ml die Bindung des Enzymkonjugates an das Immunosorbens fast linear hemmt, wurde dieser Bereich als Standardkurve ausgewählt (siehe 3.4.2.1.1). Die in 10 % MeOH/PBS angelegten Standards enthielten 0,4; 2,0; 10,0; 50,0; 250,0 und 1250,0 pg DAS/ml. Als Nullprobe diente eine toxinfreie 10 %ige MeOH/PBS-Lösung.

Die Durchführung des Elisa erfolgte nach 3.4.2.1.1, wobei für jede der nachfolgenden Antiserumverdünnungen vier verschiedene DAS-HS-HRP-Verdünnungen verwendet wurden:

Verdünnungen von	
Antiserum 5	DAS-HS-HRP
1:1000	1:10000
1:2000	1:15000
1:3000	1:20000
	1:25000

Zur Beurteilung des Nachweisverfahrens wurden innerhalb der Standardreihen die Variationskoeffizienten der Extinktionswerte berechnet und die Nachweisgrenze für das DAS ($\bar{x} + 2 s$) bei einem Vertrauensbereich von 99 % ermittelt.

3.4.3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der nach 3.4.2.1.1 durchgeführten Versuche (Abb. 9 und 10) zeigen, daß das Antiserum 5 bei einer Verdünnung von 1:2000 und einer Enzymkonjugatverdünnung von 1:16000 die höchste Spezifität besitzt. Schon sehr geringe Toxinkonzentrationen (ab 203 fg/ml) sind in der Lage, die Bindung des DAS-HS-HRP an das Immunosorbens zu hemmen. Im Bereich von 609 fg bis 1,3 ng DAS/ml ergibt sich bei steigender Toxinmenge eine fast lineare Abnahme der Extinktionswerte. Diese lineare Abnahme ist dem optimalen Meßbereich gleichzusetzen. Die Hemmkurve flacht sich erst ab 4 ng DAS/ml stark ab und erreicht bei 111 ng/ml die Basislinie. Die Seren 3 und 4 zeigen einen unregelmäßigen Kurvenverlauf, wobei bei Serum 3 erst ab 5,4 pg DAS/ml eine deutliche Extinktionsabnahme eintritt. Eine geringere Affinität ist bei den Seren 6 bis 8 festzustellen, da erst ab 12 ng DAS/ml eine bemerkbare Hemmung der Enzymkonjugatbindung eintritt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die weiteren Versuche zur Erstellung eines ELISA-Systems mit dem Antiserum 5 durchgeführt.

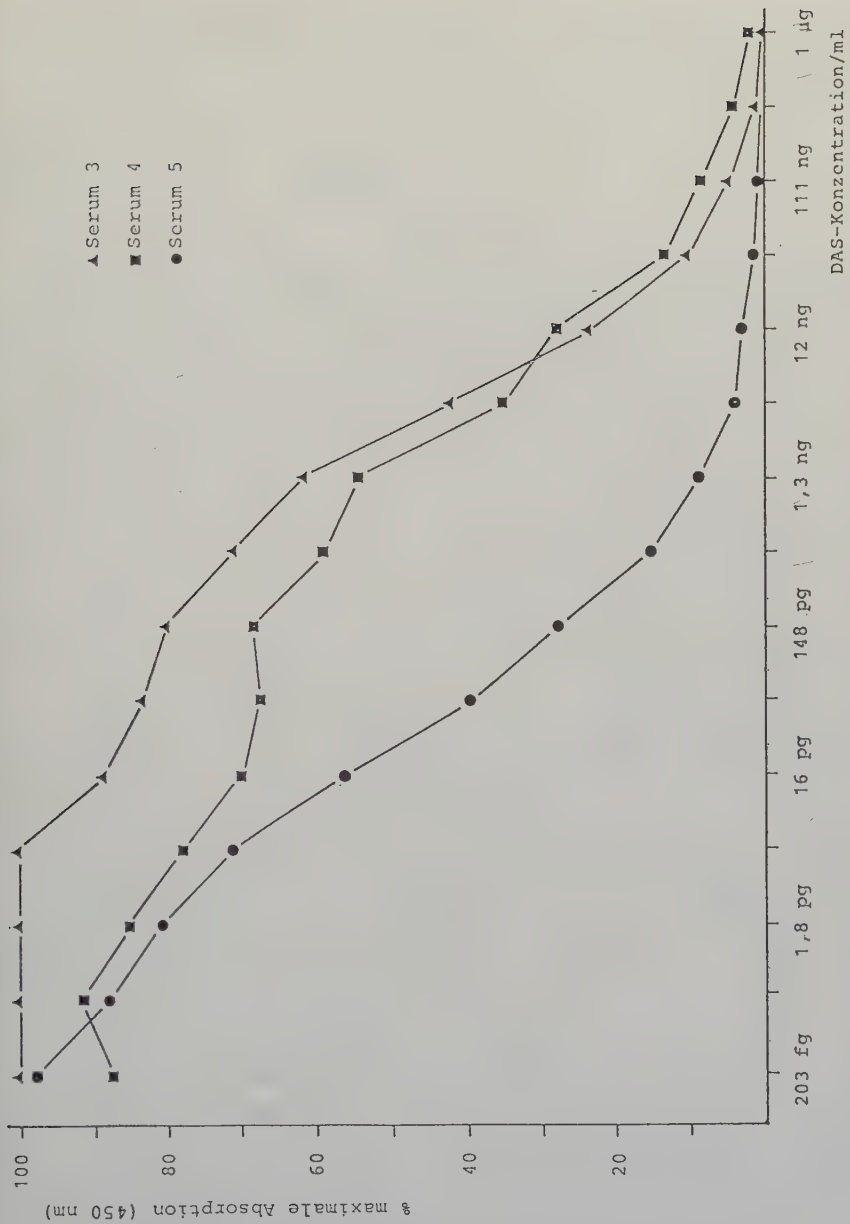


Abbildung 9: Hemmung der Bindung des DAS-HS-HRP an das Immunosorbens (Antiserum 3,4,5) durch freies DAS

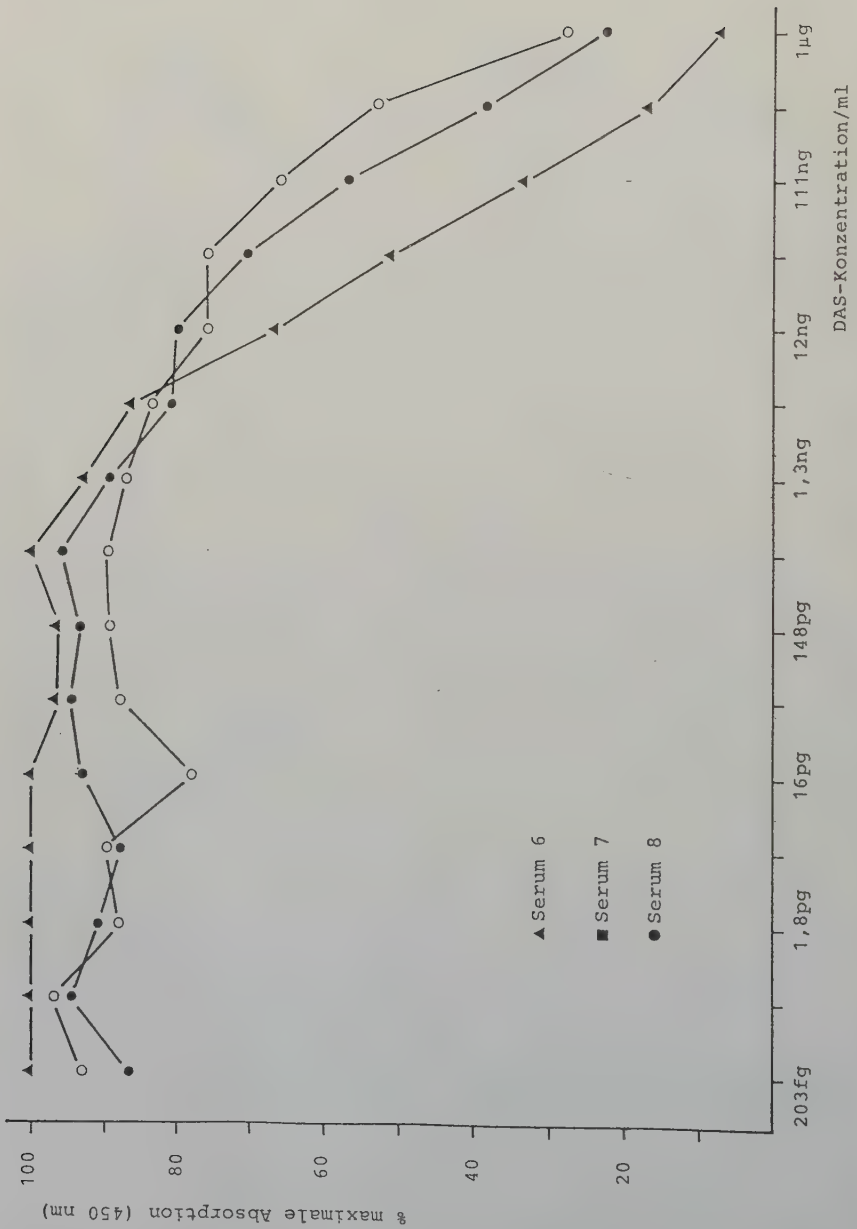


Abbildung 10: Hemmung der Bindung des DAS-HS-HRP an das Immunosorbens (Antiserum 6,7,8) durch freies DAS

DAS, DAS-HS und DAS-HG hemmten schon in geringen Mengen die Enzymaktivität. Die höchste Empfindlichkeit zeigte dabei Antiserum 5, da hier schon ab 4 ng Toxin/ml eine starke Extinktionsabnahme eintrat.

Typische Hemmkurven für das Antiserum 5 sind in Abb.11 dargestellt.

Bei der Auswertung der in 3.4.2.3 ermittelten Ergebnisse zeigte sich, daß eine Antiserumverdünnung von 1:2000 (in Bicarbonatpuffer) sehr gut zur Durchführung eines enzymatischen Nachweisverfahrens geeignet war. Für diese Serumverdünnung ergaben sich bei den verschiedenen DAS-HS-HRP-Konzentrationen die in Abb. 12 dargestellten Standardkurven. Daraus ist ersichtlich, daß die Höhe der gemessenen Substratumsatzes mit zunehmender Enzymkonjugatverdünnung abnimmt. Unter Berücksichtigung des Kurvenverlaufes, der gemessenen Extinktionen und der Standardabweichungen wurde eine optimale DAS-HS-HRP-Verdünnung von 1:15000 (in 2% FCS/PBS) ermittelt. Der beste Meßbereich liegt zwischen 2 und 250 pg DAS/ml, da in diesen Bereich ein sigmoider Kurvenverlauf vorherrscht. Die Standardabweichungen betragen zwischen 4,0 und 1,8 %. Die Nachweisgrenze für das DAS in wäßrigen Lösungen liegt bei 1,0 pg/ml. Im weiteren Versuchsverlauf gemachte Erfahrungen zeigten, daß eine DAS-HS-HRP-Verdünnung von 1:16000 ebenfalls noch sehr gut für den ELISA geeignet war.

Wird das Enzymkonjugat stärker verdünnt, so flacht sich der Kurvenverlauf immer mehr ab und die Unterschiede zwischen den einzelnen Meßpunkten werden undeutlicher. Die Standardabweichungen werden durch die unterschiedlichen Verdünnungen nicht beeinflusst.

3.4.4 Standardisierung

3.4.4.1 Methodik

Als Standardmethode wurde folgendes Verfahren gewählt:

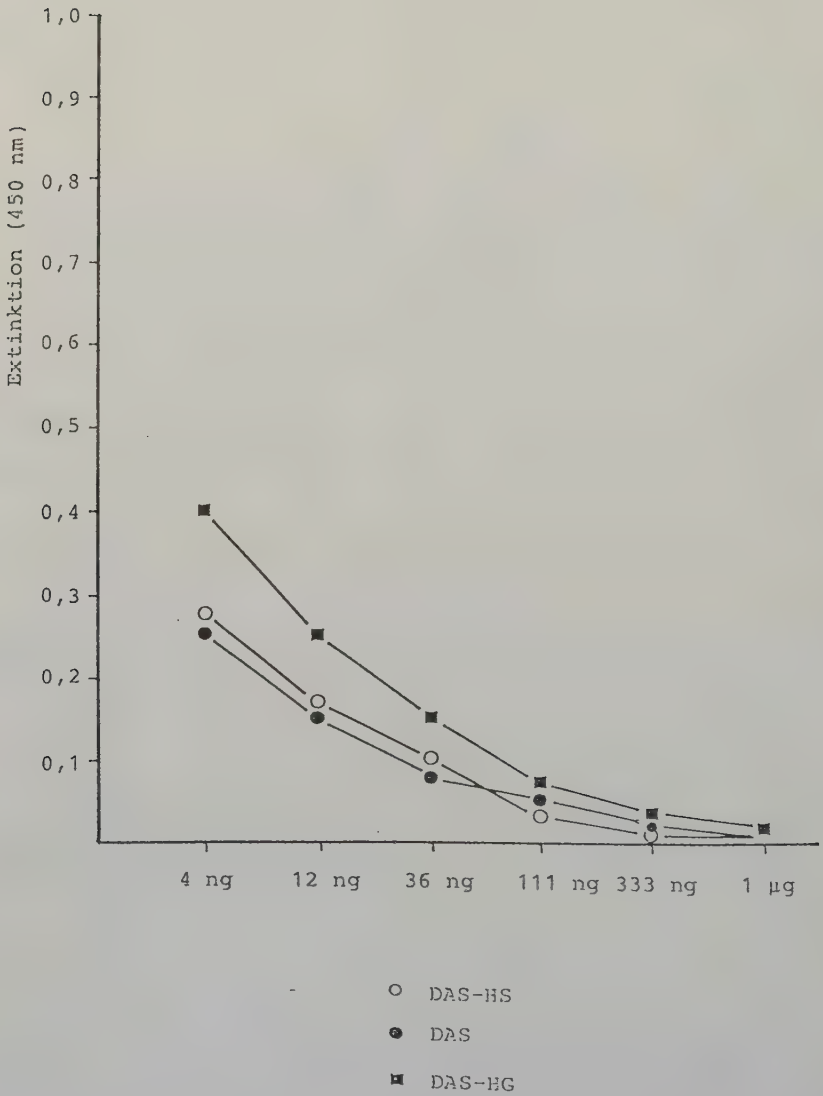
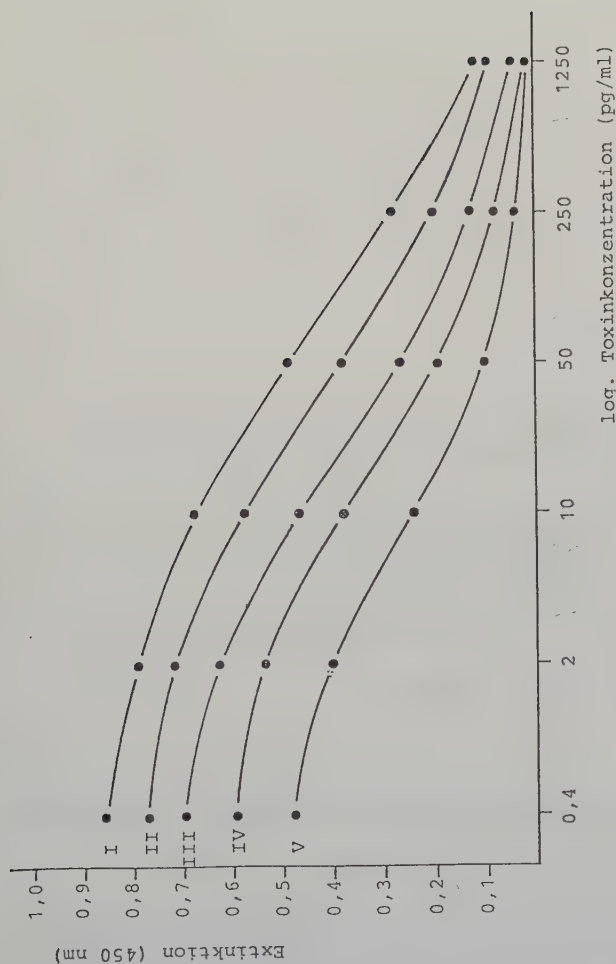


Abbildung 11: Hemmung der Bindung des DAS-HS-HRP an das Immunosorbens (Antiserum 5) durch DAS-HG, DAS-HS und DAS.



DAS-HS-HRP-Verdünnungen:

I : 1:10000

III: 1:20000

V : 1:30000

II: 1:15000

IV : 1:25000

Abbildung 12: Standardkurven für das simultane Nachweisverfahren bei unterschiedlichen
DAS-HS-HRP-Verdünnungen

Die Platten wurden mit Antiserum 5 in einer Verdünnung von 1:2000 in Carbonat-Bicarbonat-Puffer (100 µl/Kavität) über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Absättigung erfolgte mit 3% FCS/PBS (150 µl/Kavität) eine halbe Stunde lang, wobei dieser und die folgenden Inkubationsschritte bei Raumtemperatur und unter leichtem Taumeln vorgenommen wurden. Nach einem Waschschrift wurden jeweils 50 µl/Kavität DAS-HS-HRP-Konjugat (1:16000 in 2% FCS/PBS) und 50 µl/Kavität des Toxinstandards (0,4, 2,0... 1250 pg DAS/ml in 10% MeOH/PBS) zugegeben und eine Stunde inkubiert. Ungebundene Reaktionspartner wurden mit einem zweiten Waschschrift entfernt. Nach TMB-Substratzugabe (100 µl/Kavität) erfolgte nach ca. 10 Minuten die Abstopfung der Enzymreaktion mit 1 Mol/l H_2SO_4 (100 µl/Kavität). Die Messung des Substratumsatzes wurde bei 450 nm durchgeführt.

3.4.4.2 Ergebnisse

Die ermittelten Werte sind in Abb.13 dargestellt. Der Kurvenverlauf zeigt eine eindeutige negative Korrelation zwischen Substratumsatz und DAS-Konzentration. Die Variationskoeffizienten innerhalb der Toxinstandardreihen, die als senkrechte Balken dargestellt sind, betragen zwischen 3,6 und 0,5 %. Steigende Extinktionswerte beeinflussen die Koeffizienten nicht. Als Nachweisgrenze wurde $\bar{x} + 2s$ aus den Nullwerten angenommen. Sie liegt bei 1 pg DAS/ml.

3.4.5 Kreuzreaktionen des Antiserums mit anderen Trichothecen

3.4.5.1 Methodik

Um die Frage zu klären, ob DAS allein spezifisch das Antiserum bindet oder ob die Bindung des DAS-HS-HRP auch durch andere verwandte Trichothecene beeinflusst wird, wurden die Untersuchungen auf die Kreuzreaktionen mittels der kompetitiven ELISA

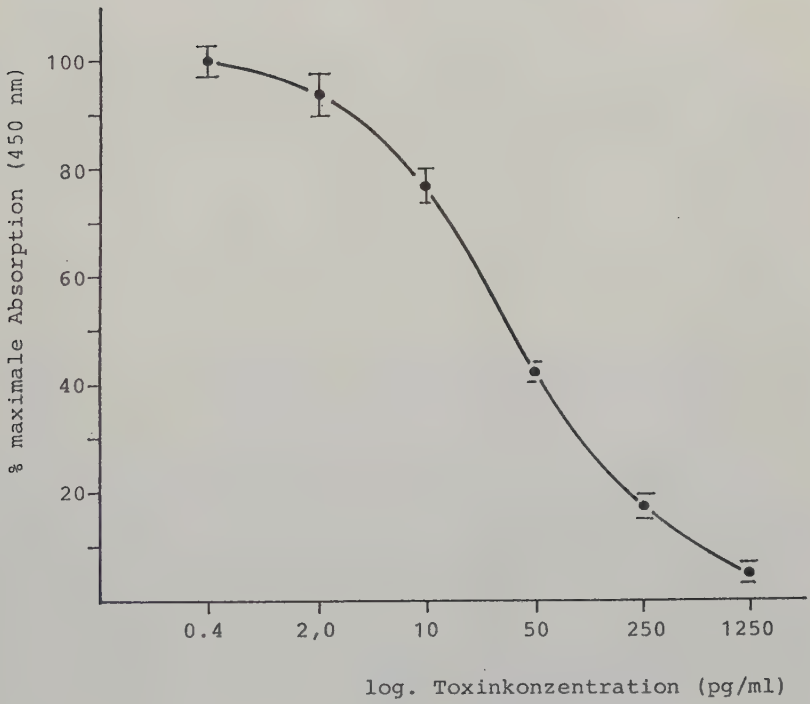


Abbildung 13: Standardkurve des simultanen ELISA für DAS

getestet. Die verwendeten Trichothecene unterschieden sich lediglich in der Struktur ihrer Seitenketten voneinander. In einem nach 3.4.4.1 durchgeführten modifizierten ELISA wurden an Stelle von DAS, die in Tab.11 aufgelisteten Toxine eingesetzt, wobei die Konzentrationen 2 μ g, 400 ng, 80 ng, 16 ng, 3,2 ng, 1,28 ng, 256 pg, 51,2 pg, 10,2 pg und 2 pg/ml in 10 % MeOH/PBS betrugen.

Um die Werte miteinander vergleichen zu können, wurden die Toxinmengen ermittelt, die eine 50 %ige Hemmung der Enzymreaktion bewirkten. Diese Werte wurden dann prozentual auf die zur selben Hemmung benötigte DAS-Menge bezogen.

3.4.5.2 Ergebnisse

Inwieweit andere Trichothecene in der Lage waren, DAS-HS-HRP an der Bindung an das Immunosorbens zu hemmen, geht aus Tab.11 hervor.

0,2240 fmol DAS/ml (0,082 ng/ml) waren für eine 50 %ige Hemmung notwendig. Danach reagierte 3 α -Acetyl-DAS noch empfindlicher im ELISA als DAS selbst, da bereits 0,0375 fmol/l (0,015 ng/ml) den Substratumsatz auf die Hälfte senkten. T2-Toxin wies dagegen nur eine Kreuzreaktivität von 5,2 % auf. 15-MAS, das nur eine Acetylgruppe aufweist, reagierte deutlich schwächer als das DAS, nämlich mit nur 1,5 %. Eine Hemmung durch die übrigen Trichothecene war gering bzw. kaum nachweisbar.

3.5 Erstellung eines konsekutiven ELISA zum Nachweis von DAS

3.5.1 Methodik

Beim konsekutiven Verfahren werden Toxin und markiertes Toxin zeitlich versetzt mit dem Antiserum inkubiert. Dies bedeutet zwar

Tabelle 11 : Kreuzreaktionen des Anti-DAS-Serums mit anderen Trichothecen (simultanes Verfahren).

Toxin	Kreuzreaktion bezogen auf DAS in %	Toxinkonzentration für eine 50 %ige Hemmung $\times 10^{-9}$ Mol/l	Molekulargewicht
3 α -Acetyl-DAS	597	0,0375	408
DAS	100	0,2240	366
T2-Toxin	5,2	4,2900	466
Neosolaniol	2,5	8,9	382
15-MAS	1,5	14,1	324
HT2-Toxin	0,03	613	424
T2-Triol	0,03	851	282
Verrucarol	0,0071	3150	266
T2-Tetraol	0,0071	3150	298
3 α -Acetyl-Deoxynivalenol	0,0038	5910	338
Nivalenol	0,0035	6410	312
Deoxynivalenol	0,0033	6750	296
Scirpentriol	0,0032	7090	282

$$\text{Kreuzreaktion (\%)} = \frac{\text{ng/ml DAS für 50 \% Hemmung}}{\text{ng/ml anderes Toxin für 50 \% Hemmung}} \times 100$$

einen zusätzlichen Inkubationsschritt, doch wird dadurch ein direkter Kontakt des Probenmaterials mit dem Toxin-Enzym-Konjugat verhindert und einer möglichen Enzymhemmung durch Störsubstanzen in der Probe vorgebeugt. Der erhöhten Nachweissicherheit steht jedoch der gesteigerte Material- und Zeitaufwand gegenüber. Die in 3.4 gewonnenen Erkenntnisse wurden auf das konsekutive Testverfahren übertragen. Der Versuchsablauf war wie folgt: In die mit Antiserum (100 μ l/Kavität, 1:2000 in Carbonat-Bicarbonat-Puffer) vorbeschichteten, abgesättigten und gewaschenen Platten wurde eine in 10 % MeOH/PBS angelegte Toxinverdünnungsreihe (100 μ l/Kavität) einpipettiert (siehe 3.4.3.1). Nach 60 min Inkubationszeit wurden die Lösungen abgesaugt und pro Kavität 100 μ l DAS-HS-HRP in einer Verdünnung von 1:32000 (in 2 % FCS/PBS) zugegeben. Ein Waschschrift folgte nach 1 h und die Enzymaktivität wurde bei 450 nm bestimmt.

Zur Klärung der Frage inwieweit das konsekutive Verfahren durch andere Trichothecene beeinflusst wird, wurden die Kreuzreaktionen nach der obengenannten Methode bestimmt, wobei an Stelle des DAS die in Tab.12 genannten Toxine getestet wurden. Die Berechnung der Toxinkonzentrationen und die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach 3.4.5.1.

3.5.2 Ergebnisse

Eine typische Standardkurve ist in Abb.14 dargestellt. Daraus wird ersichtlich, daß sich der Meßbereich ab 50 pg DAS/ml deutlich abflacht und höhere Konzentrationen als 50 pg/ml ohne Verdünnung kaum mehr bestimmt werden können. Die Standardabweichungen liegen zwischen 1,2 und 5,8 % und sind damit etwas höher als die im simultanen Verfahren ermittelten. Die Nachweisgrenze für DAS liegt mit etwa 2,0 pg DAS/ml nur unwesentlich höher.

Die für die Kreuzreaktionen ermittelten Werte sind in Tab.12 dargestellt. Daraus wird ersichtlich, daß schon 0,0368 fmol

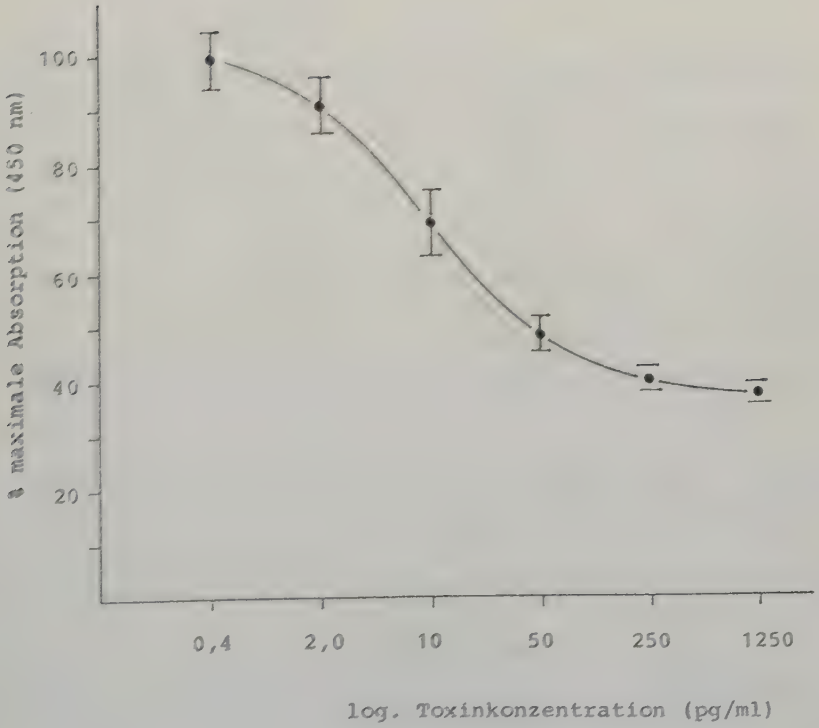


Abbildung 14: Standardkurve des konsekutiven ELISA für DAS

Tabelle 12 : Kreuzreaktionen des Anti-DAS-Serums mit anderen Trichothecen (konsekutives Verfahren).

Toxin	Kreuzreaktion bezogen auf DAS in %	Toxinkonzentration für eine 50 %ige Hemmung $\times 10^{-9}$ Mol/l	Molekulargewicht
3 μ -Acetyl-DAS	178,3	0,0368	408
DAS	100	0,0656	366
T-2 Toxin	0,09	72,96	466
Neosolaniol	0,062	100,47	382
15-MAS	0,02	324,00	324
T2-Tetraol	0.0078	838,90	298
HT2-Toxin	< 0,0027	> 2358,00	424
3 μ -Acetyl-deoxynivalenol	< 0,022	> 2958,00	338
Nivalenol	< 0,0020	> 3205,00	312
T2-Triol	< 0,0018	> 3548,00	282
Scirpentriol	< 0,0018	> 3546,00	282

$$\text{Kreuzreaktion (\%)} = \frac{\text{ng/ml DAS für 50 \% Hemmung}}{\text{ng/ml anderes Toxin für 50 \% Hemmung}} \times 100$$

3 μ -Acetyl-DAS (178,3 % gegenüber DAS) mit dem Anti-DAS-Serum reagieren, während zu einer 50 %igen Hemmung der Enzymreaktion 0,0656 fmol DAS benötigt werden. T2-Toxin, Neosolaniol und 15-MAS reagieren dagegen nur zu 0,09, 0,062 bzw. zu 0,02 %. Eine Hemmung durch andere Trichothecene ist kaum noch nachweisbar.

3.6 Entwicklung eines ELISA mittels Double Antibody-Solid-Phase (DASP)-Technik

3.6.1 Methodik

In Vorversuchen wurden Antiserum und Toxin-Enzym-Konjugat aufeinander abgestimmt, dabei ergaben sich Arbeitsverdünnungen von 1:7000 bzw. 1:30000 als optimal. Die Endverdünnungen (nach Zugabe der übrigen Reagenzien) betrugen 1:21000 für das Antiserum und 1:90000 für das Enzym-Konjugat.

Das Immunosorbens wurde nach der Methode von ARAKAWA et al. (1981) hergestellt. Dazu wurden die Platten mit 10 μ g Schaf-Anti-Kaninchen IgG/ml (100 μ l/Kavität, in Carbonat-Bicarbonat-Puffer verdünnt) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30minütiger Absättigung mit 3 % FCS/PBS (150 μ l/Kavität) und Waschen wurden zu gleichen Teilen (je 33,3 μ l/Kavität) Antiserum, Toxin-Enzym-Konjugat und Toxinstandards dazugegeben. Nach einem Waschschrift und Zugabe von TMB-Substrat (100 μ l/Kavität) wurde die Reaktion mit 1 Mol/l H_2SO_4 abgestoppt und die gebundene Enzymaktivität bei 450 nm gemessen.

3.6.2 Ergebnisse

Die Standardkurve ist in Abb.15 dargestellt. Die Nachweisgrenze für DAS liegt bei 2,2 pg/ml. Die Standardabweichungen für Mehrfachbestimmungen liegen in der Regel zwischen 5,4 und 0,2 %.

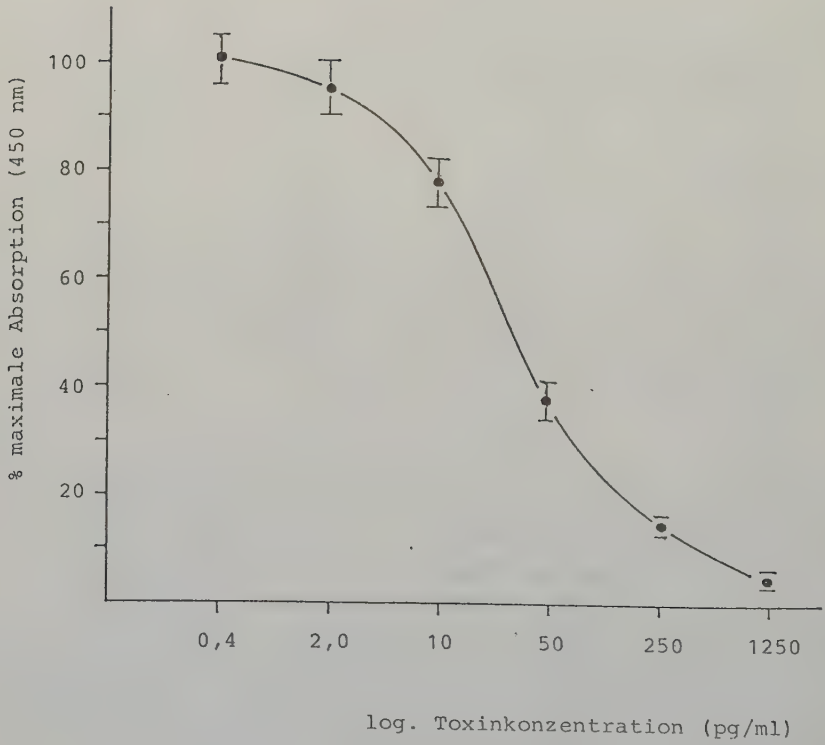


Abbildung 15: Standardkurve des Doppelten Antikörper-ELISA für DAS.

Der optimale Meßbereich ergibt sich zwischen 10 und 200 pg DAS/ml.

3.7 Nachweis von DAS in Lebens- und Futtermitteln

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Eignung des enzymimmunologischen Verfahrens als eine möglichst einfache und schnelle Screening-Methode zum Nachweis von DAS in schwierigen und inhomogenen Probenmaterialien zu prüfen.

3.7.1 Material

Bei dem Untersuchungsmaterial (Hafer, Gerste, Weizen, Mais und Heu) handelte es sich um käuflich erworbene Proben, die als Lebens- oder Futtermittel angeboten wurden.

Zur Durchführung des ELISA wurden die unter 3.4.1 beschriebenen Materialien verwendet.

- Sep-Pak C 18-Kartuschen (Waters Associates)
- Schüttelevaporator Vortex Evapotec TN (Haake Buchler)

Alle unter 3.4.1 nicht erwähnten Reagenzien waren p.a.-Qualität und wurden von E. Merck (Darmstadt) bezogen.

3.7.2 Methodik

3.7.2.1 Extraktionsverfahren

Das nachfolgend beschriebene Verfahren diente als Standardmethode, die für die Entfettung und Sep-Pak-Reinigung der Extrakte aus einigen Probenarten nur leicht modifiziert wurde.

Von Weizen, Gerste, Hafer, Mais und Heu wurden mindestens je 10 Proben im Mixer zerkleinert und durchmischt. Anschließend wurden je 2 g Probenmaterial eingewogen und mit 0, 1250, 2500 und 5000 ppt DAS (in MeOH) versetzt. Nach einer Einwirkungszeit von 5 min wurde das MeOH bei ca. 70 °C abgedampft und 18 ml der jeweiligen Extraktionslösung zugegeben. Als Extraktionslösungen wurden 100 % MeOH, 80 % MeOH/PBS, 60 % MeOH/PBS, 40 % MeOH/PBS, 20 % MeOH/PBS und Ethylacetat verwendet. Das Probenmaterial wurde 15 min langsam gerührt und anschließend 10 min bei 3000 U/min und 4°C zentrifugiert.

Sep-Pak-Reinigung der Extrakte :

Um Störsubstanzen aus den Extrakten zu entfernen, wurde bei einigen Proben eine Aufbereitung mit C-18 Sep-Pak Kartuschen durchgeführt.

Die Kartuschen wurden zuerst hintereinander mit 5 ml aqua dest., 10 ml MeOH und dann mit 10 ml aqua dest. vorgespült. Anschließend wurden langsam 20 ml der 1:4 (in aqua dest.) verdünnten Extrakte aufgegeben und mit 5 ml aqua dest. nachgespült. Polare Substanzen, die den ELISA stören könnten, wurden mit 20 ml 10 % MeOH/aqua dest. entfernt. Die Elution erfolgte mit 5 ml 80 % MeOH/aqua dest..

Entfettung der Extrakte:

Von jedem Hafer- und Maisprobenextrakt wurden je 2 ml mit dem gleichen Volumen Hexan vermischt. Anschließend wurde 5 min geschüttelt und zur besseren Trennung bei 3000 U/min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde entnommen und im ELISA eingesetzt.

Extraktion mit Ethylacetat:

Die nach der Standardmethode mit Ethylacetat extrahierten Weizen- und Gerstenproben, mußten anschließend im Schüttelevaporator abgedampft werden, um Störungen des ELISA-Systems durch das Lösungsmittel zu verhindern. Die Rückstände wurden in 2 ml MeOH gelöst, mit 18 ml 10 % MeOH/PBS auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und im ELISA untersucht.

3.7.2.2 ELISA

Die unterschiedlich aufbereiteten Probenextrakte wurden in PBS 1:10 verdünnt und im Vierfachansatz mit dem in 3.4.4 beschriebenen simultanen Testverfahren untersucht.

Die Versuchsauswertung erfolgte mit einem am Institut entwickeltem Computerprogramm (MÄRTLBAUER, 1986).

Um die durch die Probenmatrix verursachten Einflüsse auf die Wiederfindungsraten auszuschließen, wurden die Nullprobenwerte von den im Testsystem ermittelten DAS-Konzentrationen der künstlich kontaminierten Proben abgezogen.

3.7.2.3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Extraktionsversuche sind in den Tabellen 13 bis 17 dargestellt.

Tabelle 13: Wiederfindungsraten von DAS-Zusätzen in Weizen
im simultanen ELISA.

Extraktionsmittel	DAS-Zusatz (in ppt)			
		1250	2500	5000
100 % Methanol	$\bar{x}$ (%)	69,8	81,0	83,1
	n	23	16	14
	s (%)	+ 15,4	+ 16,4	+ 18,4
	v (%)	22	20	22
80 % Methanol	$\bar{x}$ (%)	108,1	135,6	138,6
	n	20	20	10
	s (%)	+ 24,3	+ 24,4	+ 12,5
	v (%)	22	18	9
60 % Methanol	$\bar{x}$ (%)	128,9	124,0	143,6
	n	12	10	11
	s (%)	+ 34,0	+ 20,9	+ 14,0
	v (%)	26	17	14
40 % Methanol	$\bar{x}$ (%)	76,1	110,4	132,6
	n	10	10	20
	s (%)	+ 10,2	+ 18,8	+ 48,2
	v (%)	13	17	36
20 % Methanol	$\bar{x}$ (%)	31,0	71,5	132,2
	n	15	10	10
	s (%)	+ 8,4	+ 11,1	+ 22,1
	v (%)	26	16	17
Ethylacetat	$\bar{x}$ (%)	82,1	45,0	33,9
	n	12	14	14
	s (%)	+ 35,8	+ 45,0	+ 38,2
	v (%)	43	62	113

Zeichenerklärung

$\bar{x}$: Mittelwert der Wiederfindungsraten aus mindestens 10
Vierfachbestimmungen
n : Probenanzahl
s : Standardabweichung
v : Variationskoeffizient

Tabelle 14: Wiederfindungsraten von DAS-Zusätzen in Gerste
im simultanen ELISA.

Extraktionsmittel		DAS-Zusatz (in ppt)		
		1250	2500	5000
100 % Methanol	$\bar{x}$ (%)	96,7	75,6	91,4
	n	10	10	10
	s (%)	+ 19,9	+ 15,6	+ 6,6
	v (%)	21	21	7
100 % Methanol, mit Hexan entfettet	$\bar{x}$ (%)	77,4	38,0	45,2
	n	10	10	10
	s (%)	+ 15,1	+ 11,9	+ 13,8
	v (%)	20	31	30
80 % Methanol	$\bar{x}$ (%)	89,3	103,2	131,3
	n	10	10	10
	s (%)	+ 18,2	+ 14,2	+ 17,0
	v (%)	20	14	13
60 % Methanol	$\bar{x}$ (%)	96,2	82,8	118,2
	n	10	10	10
	s (%)	+ 12,2	+ 59,0	+ 18,7
	v (%)	13	7	16
Ethylacetat	$\bar{x}$ (%)	71,1	35,1	31,4
	n	10	10	10
	s (%)	+ 36,9	+ 35,1	+ 27,8
	v (%)	52	38	89

Zeichenerklärung

-
- x : Mittelwert der Wiederfindungsraten aus mindestens 10
Vierfachbestimmungen
- n : Probenanzahl
- s : Standardabweichung
- v : Variationskoeffizient

Tabelle 15: Wiederfindungsraten von DAS-Zusätzen in Hafer
im simultanen ELISA.

Extraktionsmittel	DAS-Zusatz (in ppt)			
		1250	2500	5000
100 % Methanol	$\bar{x}$ (%)	93,6	119,1	94,6
	n	11	17	13
	s (%)	+ 17,6	+ 32,2	+ 23,7
	v (%)	19	27	25
100 % Methanol, mit Hexan entfettet	$\bar{x}$ (%)	69,0	98,1	37,0
	n	10	10	10
	s (%)	+ 23,5	+ 38,3	+ 14,0
	v (%)	34	39	14
100 % Methanol, mit Sep-Pak aufbereitet	$\bar{x}$ (%)	60,0	58,4	36,7
	n	21	13	11
	s (%)	+ 41,5	+ 27,2	+ 19,6
	v (%)	69	47	53
80 % Methanol	$\bar{x}$ (%)	75,6	116,1	176,1
	n	10	11	10
	s (%)	+ 17,0	+ 17,4	+ 20,8
	v (%)	23	15	12
60 % Methanol	$\bar{x}$ (%)	70,6	113,9	133,7
	n	10	13	13
	s (%)	+ 13,7	+ 26,1	+ 42,9
	v (%)	19	23	32
Ethylacetat	$\bar{x}$ (%)	72,0	117,6	69,3
	n	10	10	14
	s (%)	72,1	36,6	29,8
	v (%)	42	31	43

Zeichenerklärung

$\bar{x}$: Mittelwert der Wiederfindungsraten aus mindestens 10
 Vierfachbestimmungen
 n : Probenanzahl
 s : Standardabweichung
 v : Variationskoeffizient

Tabelle 16: Wiederfindungsraten von DAS-Zusätzen in Mais
im simultanen ELISA.

Extraktionsmittel		DAS-Zusatz (in ppt)		
		1250	2500	5000
100 % Methanol	$\bar{x}$ (%)	61,0	91,1	90,7
	n	20	17	10
	s (%)	+ 20,4	+ 26,8	+ 13,2
	v (%)	34	29	15
100 % Methanol, mit Hexan entfettet	$\bar{x}$ (%)	47,2	58,4	52,5
	n	18	10	10
	s (%)	+ 24,8	+ 17,0	+ 8,4
	v (%)	52	29	16
100 % Methanol, mit Sep-Pak aufbereitet	$\bar{x}$ (%)	40,5	37,0	36,6
	n	18	11	10
	s (%)	+ 16,0	+ 19,4	+ 16,1
	v (%)	40	53	44

Tabelle 17: Wiederfindungsraten von DAS-Zusätzen in Heu
im simultanen ELISA.

Extraktionsmittel		DAS-Zusatz (in ppt)		
		1250	2500	5000
100 % Methanol	$\bar{x}$ (%)	80,8	92,4	85,4
	n	10	10	10
	s (%)	+ 20,2	+ 18,7	+ 19,3
	v (%)	25	20	23

Zeichenerklärung

-
- x : Mittelwert der Wiederfindungsraten aus mindestens 10
Vierfachbestimmungen
- n : Probenanzahl
- s : Standardabweichung
- v : Variationskoeffizient

Es konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei den in den Nullproben festgestellten "DAS"-Konzentrationen um natürlich vorkommendes Toxin oder um von der Probenmatrix verursachte falsch positive Meßergebnisse handelte.

Die besten Wiederfindungsraten ließen sich mit 100 %igem MeOH erzielen, wobei sich Heu besonders gut als Untersuchungsmaterial eignete. Hier konnten zwischen 80,8 und 92,4 % des zugesetzten Toxins nachgewiesen werden. Die Standardabweichungen lagen zwischen 18,7 und 20,2 %.

Bei den Getreidearten konnte DAS in Gerste am besten DAS wiedergefunden werden, nämlich zwischen 75,6 und 96,7 %, bei Standardabweichungen von 6,6 - 19,9 %.

In Weizen und Mais wurden 69,8 - 83,1 % ($s = 15,4 - 18,4$ %) bzw. 61,0 - 91,1 % ($s = 13,2 - 26,8$ %) des zugesetzten Toxins ermittelt.

Bei Hafer lagen die Wiederfindungsraten bei über 93 % ($s = 17,6 - 32,2$ %), doch wirkte sich ein Wiederfindungsergebnis von 119,1 % bei 2500 ppt negativ auf die Nachweissicherheit aus.

Bei Verwendung von polareren Extraktionsmitteln als 100 % MeOH (z. B. 80 %iges MeOH) traten vermehrt falsch positive Testergebnisse auf, während die Streuungsparameter fast unverändert blieben. Am deutlichsten zeigte sich dies beim Weizen, in dem bis zu 143,6 % DAS wiedergefunden wurden.

Eine Aufbereitung der Hafer- und Maisextrakte mit Sep-Pak-C 18 Kartuschen senkte die Wiederfindungsraten in starkem Maße und führte zum Ansteigen der Standardabweichungen und Variationskoeffizienten.

Einen ähnlichen, aber abgeschwächteren Effekt zeigte eine Entfettung der Extrakte mit Hexan. Bei Gerste, Hafer und Mais konnten nur noch 38,0 - 77,4 %; 37,0 - 98,1 % bzw. 47,2 - 58,4 % des zugesetzten Toxins ermittelt werden.

Mit Ethylacetat wurden sehr geringe Wiederfindungsraten mit hohen Schwankungsbreiten festgestellt. Sie lagen für Weizen, Gerste und Hafer bei 33,9 - 82,1 %, 31,4 - 71,1 % bzw. 69,3 - 117,6 %.

4 Diskussion

Angesichts der möglichen Gefährdung der menschlichen und tierischen Gesundheit durch DAS in Lebens- bzw. Futtermitteln wurden in den letzten Jahren einige physikalisch-chemische Nachweismethoden für DAS entwickelt, wie GC (UENO et al., 1973), HPLC (SCHMIDT et al., 1981), GLC (ROMER et al., 1978) und GC-MS (GAREIS et al., 1985).

Die meisten dieser Verfahren erfordern bei nicht immer befriedigender Nachweismempfindlichkeit teure Apparaturen, erheblichen Verbrauch an organischen Lösungsmitteln und großen Zeitaufwand. Ihre Brauchbarkeit für die routinemäßige Untersuchungen von größeren Probenzahlen an Lebens- und Futtermitteln ist deshalb sehr eingeschränkt.

Für das mit dem DAS verwandte T2-Toxin wurden in den letzten Jahren relativ leicht anwendbare spezifische und sensitive ELISAs erstellt (PESTKA et al., 1981; PETERS et al., 1982; FAN et al., 1984; GENDLOFF et al., 1984 und ESGIN 1987), die einen wesentlich größeren Probendurchsatz ermöglichen. Leider reagieren die T2-Toxin-Antikörper nicht mit DAS, so daß zur Erstellung eines DAS-ELISA ein spezifisch gegen diese Substanz gerichtetes Antiserum erforderlich war.

Obwohl CHU et al. (1984) und ZHANG et al. (1986) bereits zwei verschiedene DAS-Antiseren entwickelt und im RIA charakterisiert hatten, wurde in der Literatur bisher noch kein DAS-ELISA beschrieben.

Da am Institut - soweit es Trichothecene betrifft - ein enzymimmunologischer T2-Toxin-Nachweis erarbeitet wurde (ESGIN, 1987), bot sich aufgrund der dabei gewonnenen Erfahrungen auch die Entwicklung eines DAS-ELISA an.

DAS besitzt wegen seines geringen Molekulargewichtes keine immunogenen Eigenschaften. Deshalb muß es vor der Immunisierung an ein Trägerprotein gekoppelt werden. DAS verfügt am C-3-Atom über eine Hydroxylgruppe, die zur Bindung einer reaktiven Gruppe geeignet ist. Zur Einführung einer Carboxylgruppe in das Toxinmolekül wurde gemäß der Methode von CHU et al. (1984) Glutarsäureanhydrid verwendet (DAS-HG). Ein DAS-HS (mit Bernsteinsäure-

anhydrid) wurde ebenfalls hergestellt, um das geeignetere dieser beiden DAS-Derivate in der Induzierung einer Immunantwort zu ermitteln.

Die Kopplung des so gewonnenen DAS-HG bzw. DAS-HS an HSA erfolgte nach der Carbodiimid-Methode von CHU et al. (1979) (siehe 3.2.2.2). Die Kopplungsrate konnte jedoch aufgrund der fehlenden UV-Absorptionseigenschaften nicht bestimmt werden.

Die Markierung von DAS mit dem Enzym HRP, d. h. die Kopplung von DAS-HS, mußte jedoch mit einem anderen Verfahren durchgeführt werden. Dabei wurden die von MÄRTLBAUER und TERPLAN (1986) beschriebenen Erfahrungen berücksichtigt: Versuchstiere, die mit Hapten-Protein-Konjugaten immunisiert werden, bilden neben Antikörpern gegen das Hapten auch solche gegen das Trägerprotein und gegen zusätzliche Epitope am Trägerprotein, die durch Modifikation durch das bei der Kopplung eingesetzte Reagenz (Carbodiimid) entstehen. Wenn das Toxin-Enzym-Konjugat mit demselben Kopplungsverfahren hergestellt wird, würde das Enzym in gleicher Weise modifiziert werden wie der Proteinträger. Das Enzymkonjugat könnte dadurch von Antikörperpopulationen, die gegen unterschiedliche Epitope gerichtet sind, gebunden werden, wodurch die Hemmung durch freies Hapten beeinträchtigt wird. Daher ist es für einen spezifischen enzymimmunologischen Nachweis erforderlich, Immunogen und Enzymkonjugat mit unterschiedlichen Kopplungsmethoden herzustellen.

Die Methode von ANDERSON et al. (1964), nach der DAS-HS als aktivierter Ester an HRP gebunden wird, war zur Herstellung des Toxin-Enzym-Konjugates sehr gut geeignet. Sie war leicht anzuwenden und erforderte keinen großen Zeit- und Materialaufwand. Der effiziente Kopplungsablauf zeigte sich in der relativ guten Stabilität und der sehr hohen Endverdünnung des im ELISA eingesetzten DAS-HS-HRP.

Die Herstellung und Lagerung des DAS-HS-HRP war jedoch nicht ganz unproblematisch. In Vorversuchen wurden jeweils aus einer DAS-HS-Charge mehrere Enzymkonjugate nach 3.1.2.1 bis 3.1.2.4 hergestellt und im direkten konsekutiven ELISA ausgetestet. Dabei

zeigte sich, daß die Spezifität des Testsystems stark vom verwendeten DAS-HS-HRP abhing. Im besten Fall ergab sich eine Nachweisgrenze von 1 pg DAS/ml, im ungünstigsten von 200 pg/ml. Der Grund hierfür dürfte in den leicht variierenden Reaktionsbedingungen und der damit verbundenen unterschiedlichen Bindung des DAS an die Meerrettichperoxidase liegen.

Wenn sich zu viele DAS-Moleküle an ein HRP-Teilchen binden, dann wird viel freies Toxin benötigt, um mit dem Enzym-Konjugat um die Bindungsstellen am Immunsorbens zu konkurrieren. Dies wirkt sich dann in einer ungünstigeren Nachweisgrenze aus.

Ohne Konservierungszusätze ließ sich das lyophilisierte Enzym-Konjugat bei - 20 °C etwa 15 Monate lang ohne Schwierigkeiten aufbewahren. Dann zeigte sich ein allmählicher Aktivitätsverlust, der sich in ansteigender Nachweisgrenze, erhöhten Standardabweichungen und unregelmäßigen Standardkurven äußerte. Tiefgefrorenes DAS-HS-HRP zersetzte sich relativ rasch schon innerhalb weniger Wochen, wobei häufiges Auftauen und Wiedereinfrieren diesen Prozess begünstigte. Zur längeren Aufbewahrung muß das Toxin-Enzym-Konjugat deshalb in kleinen Portionen aufgeteilt und lyophilisiert werden.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zeigten, daß dieser Aktivitätsverlust durch den zunehmenden Zerfall des Enzymkonjugates in DAS, DAS-HS und HRP bedingt war. Auf die mangelnde Stabilität der HS-Verbindungen von Mykotoxinen wiesen LAU et al. (1981) hin. Sie stellten fest, daß Aflatoxin B₂α-HS bei Raumtemperatur schon nach 24 Stunden zu 50 % hydrolysiert wurde.

Die Immunisierung der Versuchstiere erbrachte einige interessante Resultate. So konnte die Feststellung von CHU et al. (1984), daß DAS-HG-Derivate bessere Immunogene darstellen als DAS-HS-Produkte, bestätigt werden, da mit DAS-HS-HSA immunisierten Kaninchen keine spezifischen Antikörper bildeten.

CHU et al. (1984) stimulierten Kaninchen mit 500 µg DAS-HG-BSA/Tier und erreichten erst nach einer langen Immunisierungszeit (> 20 Wochen) und wiederholten Restimulierungen Antikörpertiter von 1:1000. Die Antikörperspiegel erreichten während eines

Immunisierungszyklus jeweils ein Maximum und sanken dann im weiteren Verlauf ab.

Bei der Verwendung von DAS-HG-HSA ließen sich die benötigte Immunogenmenge, die Immunisierungsdauer und damit die Belastung der Tiere stark reduzieren. Trotz der geringen Konzentration von 194 µg DAS-HS-HSA/Tier konnten bereits 6 Wochen nach der Grundimmunisierung maximale Antikörpertiter von 1:7290 erreicht werden. Die Titer behielten über lange Zeit ihr hohes Niveau bei und konnten durch wiederholte Restimulierungen nicht nennenswert gesteigert werden. Wie der Titerverlauf des Kaninchens 5 (siehe Tab.9) zeigt, läßt sich mit einer Grundimmunisierung und einer Auffrischungsimpfung über fast ein Jahr ein konstant hoher Antikörperspiegel aufrechterhalten. Lang andauernde Belastungen der blutbildenden Organe durch häufige Blutentnahmen beeinflussten dabei Antikörpertiter und -spezifität nicht.

Der Grund für die mangelnde Immunogenität des DAS-HS-HSA liegt laut Chu et al. (1984) in der mangelnden Stabilität des HS-Derivates durch rasche Hydrolyse des Succinates vom Proteinträger. Dies konnte durch die oben bereits erwähnte Instabilität des DAS-HS-HRP bestätigt werden.

Während des Immunisierungsvorganges findet im Organismus aber auch noch eine "in vivo - Hydrolyse " der Esterbindung und damit ein Zerfall in DAS und Succinatderivate statt (Chu et al., 1984). Die immunsuppressiven Eigenschaften, aber auch die rasche Metabolisierung des Toxins (siehe 1.8) verhindern dann die Stimulierung der immunkompetenten Zellen und somit die Produktion von Antikörpern. Andererseits besitzt DAS-HG-HSA eine längere Kohlenstoffbrücke zum Trägerprotein und kann sich deshalb leichter um die Bindungsachse drehen. Die determinanten Gruppen sind dann für die Lymphozyten besser zugänglich und es läßt sich somit leichter eine Immunantwort induzieren.

In den Versuchen zur Antikörpertiterbestimmung wurde OPD in Verbindung mit H_2O_2 als Substrat zur Messung der gebundenen Enzymaktivität verwendet. Diese Substanz weist jedoch carcinogene Eigenschaften auf, so daß aus gesundheitlicher Sicht der Ersatz durch ein weniger schädliches Reagenz vorteilhaft wäre. Daher wurde für die weiteren Experimente TMB benutzt, wobei

die 4 Methylgruppierungen die krebserzeugende Wirkung des Benzidins mindern (GALATTI und PRACHT, 1985). Ein Vergleich der beiden verwendeten Substrate zeigt, daß sich bei gleicher Inkubationsdauer mit TMB deutlich höhere Extinktionswerte und niedrigere Standardabweichungen innerhalb der einzelnen Toxinstandardreihen erzielen ließen als mit OPD.

Die Überprüfung der Spezifität der Antikörper im kompetitiven simultanen ELISA ergab, daß das Antiserum 5 eine hohe Affinität und Spezifität für DAS besaß (siehe 3.4.2.1.1). Bei einer Serumverdünnung von 1:2000 und einer Enzym-Konjugatverdünnung von 1:16000 wurde im Bereich von 609 fg - 1,3 ng DAS/ml die Enzymaktivität sehr stark gehemmt. Bei den Seren der Tiere Nr.3 und 4 trat erst ab 5,4 pg bzw. 148 pg DAS/ml eine starke Extinktionsabnahme ein (siehe Abb.9). Bei den Seren 6 bis 8 war dies sogar erst ab 12 ng/ml festzustellen (siehe Abb.11).

Der Grund für die schlechtere Affinität dürfte in der stärkeren Metabolisierung des Immunogens durch die Versuchstiere liegen. Die oben erwähnte "in vivo - Hydrolyse" des DAS-HG-HSA führt zur Abspaltung des HSA und HG vom Toxinmolekül. Dadurch treten die bisher verdeckten immunsuppressiven Eigenschaften des freien DAS wieder in den Vordergrund und erschweren die Entwicklung einer Immunreaktion. Bei Kaninchen Nr.5 waren diese Stoffwechselprozesse wohl weniger wirksam, wodurch das Immunogen länger im Körper verbleiben und die Bildung von hochspezifischen Antikörpern induzieren konnte. Das Tier verfügte möglicherweise auch noch über ein für die immunsuppressiven Trichothecene weniger sensibles Abwehrsystem.

Die Antikörper des Serum 5 reagieren nicht nur sehr stark mit DAS, sondern auch mit DAS-HG (siehe Abb.12). Daraus wird ersichtlich, daß der Organismus nicht bloß Antikörper gegen das Toxin, sondern auch gegen die Kohlenwasserstoffbrücke zwischen DAS und HSA, die von HG gebildet wird, produziert. Da sich DAS-HS lediglich durch eine CH_2 -Gruppe von DAS-HG, das Bestandteil des Immunogens war, unterscheidet, reagiert es stark mit dem gegen die HG-Brücke gerichteten Antikörper.

Für die Erstellung des ELISA-Systems ist nicht nur die Sensitivität der Antikörper gegen DAS von großer Bedeutung, sondern auch die Frage, inwieweit andere engverwandte Trichothecene in der Lage sind, sich an die spezifischen Antikörper zu binden und somit einen spezifischen DAS-Nachweis erschweren.

Die Überprüfung der Kreuzreaktionen des Anti-DAS-Serums im simultanen und konsekutiven ELISA mit anderen Trichothecenen ergab (siehe Tab.11 und 12), daß die stärkste Hemmung der Bindung des DAS-Enzymkonjugates im Test-System durch

3 α -Acetyl-DAS erfolgte. Diese Substanz kann in weitaus geringeren Spuren nachgewiesen werden als DAS selbst. Das liegt daran, daß 3 α -Acetyl-DAS aufgrund seiner Acetylgruppe am R-1 dem zur Immunisierung verwendeten DAS-HG ähnlicher ist als das DAS. Die Acetylgruppe lagert sich dann an das gegen die HG-Brücke gerichtete Epitop an, was eine leichtere und stärkere Bindung des 3 α -Acetyl-DAS an die Antikörper bedingt.

Weitaus geringere Kreuzreaktionen zeigte das Antiserum mit T2-Toxin, Neosolaniol und 15-MAS. Im simultanen ELISA liegen die maximalen Werte unter 5,2 % und im konsekutiven Verfahren sogar unter 1 %.

Für die 50 %ige Hemmung der Enzymreaktion durch ein bestimmtes Toxin wird im konsekutiven ELISA deutlich weniger benötigt als im simultanen. Dies ist durch die fehlende direkte Konkurrenz von Toxin und Toxin-Enzym-Konjugat bedingt. Im konsekutiven ELISA lagern sich diese beiden Substanzen nacheinander ohne gegenseitige Beeinflussung an das Immunosorbens an, wobei es zu einer leichteren Verdrängung des DAS-HS-HRP kommt.

Aus den oben vorliegenden Ergebnissen wird deutlich, daß die Antikörper eine hohe Spezifität für DAS besitzen. Es ist daher auch verständlich, daß die Antikörper Trichothecene, die sich stark vom DAS unterscheiden nicht mehr erkennen können.

Bei der Betrachtung der Kreuzreaktionen des simultanen ELISA wird die überragende Bedeutung der Seitenketten bei der Determinierung der Antikörperspezifität deutlich. Eine dominierende Rolle spielt dabei die Acetylgruppe an der C-4-Position (R-2). Eine

Eliminierung dieser Gruppe im DAS- oder T2-Toxin-Molekül, wobei 15-MAS bzw. HT2-Toxin entstehen, führt zu einem fast vollständigen Abfall der Toxinbindungskapazität durch den Antikörper auf 1,5 % bzw 0,03%.

Einen wesentlichen Einfluß übt auch R-5 aus. Die Einführung eines einzigen Sauerstoffatoms an der C-8-Position unter Bildung einer Hydroxylgruppe (Neosolaniol) reduziert die Reaktivität der Antikörper auf 2,5%. Eine Isovalerylgruppe verursacht dagegen nur einen geringeren Abfall. So sinken bei Einführung dieser Struktur in 15-MAS (HT2-Toxin) die Kreuzreaktionen von 1,5 % auf 0,03 % ab.

Die Acetylierung des DAS am R-1 (3'-Acetyldiacetoxyscirpenol) verursacht jedoch einen bedeutenden Anstieg der Bindungskapazität, da dieses Toxin eine starke Ähnlichkeit mit dem zur Immunisierung verwendeten DAS-HG aufweist.

R-3 und R-4 scheinen nur einen geringen Einfluß bei der Bildung spezifischer Antikörper zu spielen, da ihre Modifikation zu keiner Veränderung, der ohnehin schon vernachlässigbar kleinen Kreuzreaktivität mit anderen Trichothecen führt.

CHU et al. (1984) sehen allerdings in R-3 die wichtigste Seitenkette. Eine Deacetylierung dieser Struktur (4-MAS) führte zu einem starken Abfall der Bindungskapazität des Antiserums. Diese Feststellung konnte jedoch nicht überprüft werden, da 4-MAS nicht käuflich zu erwerben ist.

Ein Vergleich des Antiserums 5 mit dem von ZHANG et al. (1986) produzierten und mittels RIA charakterisierten Antiserum (Antiserum A) zeigt, daß Antiserum 5 eine weitaus höhere Spezifität und Sensitivität besitzt. So wurden für eine 50 %ige Hemmung der Enzymaktivität im simultanen ELISA nur 0,081 ng DAS/ml benötigt, während bei Antiserum A 519mal mehr Toxin, nämlich 42 ng eingesetzt wurden.

Bei den Kreuzreaktionen konnten ebenso große Differenzen festgestellt werden. Für Acetyl-DON lag die Kreuzreaktivität des Antiserums A bei 1,4 %, die von Antiserum 5 jedoch bei 0,0038 %. Mit T2-Toxin und Neosolaniol reagiert Antiserum A zu 0,93 % bzw. 0,37 %, Antiserum 5 jedoch zu 5,2 % bzw. 2,5 %. Betrachtet man

aber die für die Hemmung notwendigen absoluten Mengen, so werden bei Antiserum A für T2-Toxin 4500 ng/ml und für Neosolaniol 11200 ng/ml benötigt, während bei Antiserum 5 nur 2 ng/ml bzw. 3,4 ng/ml eingesetzt werden müssen.

Berücksichtigt man die im konsekutiven ELISA ermittelten Werte, so wird die Qualität des Antiserum Nr.5 noch deutlicher (siehe Tab.12).

Die von CHU et al. (1984) produzierten Antikörper (Antiserum B) benötigen 15 ng DAS/ml, damit der Substratumsatz auf die Hälfte gesenkt wird.

Die im RIA verwendeten Verdünnungen betrugen für Antiserum A 1:36 und für Antiserum B sogar nur 1:10. Im konsekutiven und simultanen ELISA konnten Endverdünnungen des Antiserums 5 von 1:2000 und im Doppelten Antikörper-ELISA sogar von 1:21000 verwendet werden. Mit der Entwicklung des simultanen, konsekutiven und DASP-ELISA stehen drei hochsensitive und spezifische Nachweissysteme für DAS zur Verfügung. Im Hinblick auf die Anwendung in der routinemäßigen Untersuchung von Lebens- und Futtermitteln erwies sich der leicht und problemlos durchzuführende simultane DAS-ELISA als besonders geeignet. Bei niedrigen Standardabweichungen, hoher Antiserum- und Toxin-Enzym-Konjugat-Verdünnung ergab sich eine Nachweisgrenze von weniger als 1 pg/ml. Bei den mit Antikörpern beschichteten Platten läßt sich eine Untersuchungsdauer von ca. 1,5 h erreichen.

Der konsekutive ELISA zeichnet sich zwar durch besonders niedrige Kreuzreaktionen mit anderen Trichothecen aus, erfordert jedoch eine um 1 h verlängerte Versuchsdurchführung. Der etwas veränderte Standardkurvenverlauf, der erhöhte Bedarf an Toxin-Enzym-Konjugat, Toxinstandards und Probenmaterial mindern den Wert dieses Testsystems bei Routineuntersuchungen.

Der DASP-ELISA ermöglicht den Einsatz geringer Mengen sehr hoch verdünnten Antiserums und DAS-HS-HRP. In Anbetracht der Tatsache, daß das Antiserum nur in begrenzten Mengen zur Verfügung steht und damit den limitierenden Faktor bei umfangreichen und länger

dauernden Massenuntersuchungen darstellt, würde dies einen enormen Einspareffekt bewirken und die Zahl der möglichen Versuche ließe sich dadurch erheblich erhöhen.

Die mit Anti-Kaninchen-IgG vorbeschichteten Platten lassen sich gekühlt tagelang aufbewahren und stehen deshalb für eine rasche Versuchsdurchführung jederzeit zur Verfügung.

Die Einführung einer zusätzlichen Komponente kann grundsätzlich die Fehlermöglichkeit des Versuchssystems erhöhen. Wie jedoch in 3.6.2 gezeigt wurde, wirkt sich dies jedoch nur in einer unbedeutenden Erhöhung der Nachweisgrenze und der Standardabweichung aus. Nachteil dieses Systems ist, daß ein zweiter Antikörper benötigt wird, der u. U. käuflich erworben werden muß. Für einen kommerziellen Anbieter sollte dies allerdings kein besonderes Problem sein. Wenn der zweite Antikörper im eigenen Labor hergestellt werden kann, entfallen wesentliche zusätzliche Kosten und dieses Nachweissystem ist den beiden anderen überlegen.

Da die oben beschriebenen Futtermitteluntersuchungen zum Großteil schon vor der Entwicklung des Doppelten Antikörper-ELISA durchgeführt worden waren und das Anti-Kaninchen IgG noch nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung stand, mußte auf die Anwendung der DASP-Technik verzichtet werden.

Trichothecene bildende Fusarien wachsen v. a. auf Getreide- und Gräserarten, die der menschlichen und tierischen Ernährung dienen. Um die daraus resultierende Gesundheitsgefährdung besser abschätzen zu können, wurde geprüft, inwieweit sich der ELISA als schnelle und einfache Screening-Methode zum Nachweis von DAS aus komplex zusammengesetzten Lebens- und Futtermitteln eignet. Dabei zeigte sich, daß die Wiederfindungsraten stark vom Extraktionsmittel abhingen.

Es gelang bei Verwendung von reinem MeOH und ohne Extraktaufbereitung im Bereich von 2500 - 5000 ppt bei fast allen Proben mehr als 80 % des zugesetzten Toxins nachzuweisen. Wenn man das natürliche Vorkommen von DAS in Getreide mit ca. 50 - 31500 ppb annimmt (siehe Tab.3), können somit problemlos weitaus geringere Spuren des Toxins als in den eigenen Versuchen ermittelt werden.

Stärker polare Lösungsmittel als 100 % MeOH (z. B. 80 % MeOH/PBS, 60 % MeOH/PBS) wirkten sich sehr unterschiedlich aus. Die Wiederfindungsraten wurden entweder gesenkt oder es traten verstärkt falsch positive Resultate bei Hafer und Weizen auf, was sich negativ auf die Nachweissicherheit auswirkte. Der Grund für den erhöhten Nachweis könnte der stärkere natürliche Befall dieser beiden Getreidearten mit Fusarien sein (siehe 2.4).

Stärker polare Lösungsmittel setzen aus der Probenmatrix vielleicht Trichothecene frei, die durch ihre Kreuzreaktionen mit dem Antiserum das ELISA-System beeinflussen.

Um Störsubstanzen zu entfernen, wurden Hafer- und Maisextrakte mit Sep-Pak C-18-Kartuschen gereinigt. Die falsch positiven Ergebnisse wurden dadurch zwar beseitigt, doch mußte eine Abnahme der Wiederfindungsraten und ein Ansteigen der Streuungsparameter (Standardabweichung, Variationskoeffizient) in Kauf genommen werden.

Etwas bessere Ergebnisse ließen sich durch die Entfettung der Extrakte von Gerste, Hafer und Mais mit Hexan erreichen. Unbefriedigende Resultate zeigte die Verwendung von Ethylacetat.

Auf eine Untersuchung von Körperflüssigkeiten, wie Milch, Harn und Serum, um die Ausscheidungsmechanismen des DAS bzw. des carry-over zu studieren, wurde verzichtet, da im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte orientierende Versuche an einem "künstlichen Pansen" ergaben, daß die Pansenflora zugesetztes DAS innerhalb von 5 h zu 50 % abbaut. BAUER et al. (1985 a,b) demonstrierten außerdem, daß resorbiertes Toxin schon nach wenigen Minuten in die mit diesem ELISA nicht mehr nachweisbaren Metaboliten MAS und SCT umgewandelt wird.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde ein schneller und hochempfindlicher DAS-Nachweis geschaffen, der in der Trichothecenanalytik die Untersuchung großer Probenzahlen ermöglicht. Für lebens- und futtermittelrechtliche Konsequenzen könnte in Kombination mit GC-MS eine zweifelsfreie Toxinidentifikation ermöglicht werden. Aus der Gesamtzahl des Untersuchungsmaterials würden nur noch die im ELISA als "DAS-positiv" erkannten Proben mit GC-MS überprüft. Derartige Untersuchungen wären in einem System, das die

serologische Erfassung auch anderer Trichothecene und Mykotoxine ermöglicht besonders sinnvoll. Aufgrund des hohen Automatisierungspotentials durch computergesteuerte Meßapparaturen kann die Effizienz derartiger Systeme noch wesentlich gesteigert werden.

5 Zusammenfassung

Zur Erstellung eines enzymimmunologischen Nachweises für Diacetoxyscirpenol (DAS) mußte zuerst ein geeignetes Antigen hergestellt werden. Dazu wurde DAS mit der Carbodiimidmethode in ein Hemiglutarat (DAS-HG) überführt und anschließend an humanes Serumalbumin (HSA) gekoppelt. Von Kaninchen, die mit diesem DAS-HG-HSA-Konjugat immunisiert worden waren, konnten bereits nach sechs Wochen spezifische Antikörper gewonnen werden.

Zur Enzymmarkierung wurde DAS in ein Hemisuccinat (DAS-HS) überführt und mit der aktiven Estermethode an Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden.

Es wurden drei ELISA-Verfahren entwickelt: a) ein kompetitiver simultaner ELISA b) ein kompetitiver konsekutiver ELISA und c) ein Doppelter Antikörper ELISA. Der kompetitive simultane ELISA erwies sich dabei als am besten geeignet. In methanolischen Lösungen konnten bei Standardabweichungen unter 4 % bis zu 1 pg DAS/ml nachgewiesen werden.

Kreuzreaktionen des Anti-Das-Antiserums mit anderen Trichothecenen ergaben sich bei 3 α -Acetyl-DAS (597 %), T2-Toxin (5,2 %), Neosolaniol (2,5 %) und 15-MAS (1,5%). Die hohe Kreuzreaktivität mit 3 α -Acetyl-DAS steht in keinem Widerspruch zur Spezifität der Antikörper, da diese Substanz dem zur Immunisierung verwendeten DAS-HG ähnlicher ist als das DAS.

In Lebens- und Futtermitteln, die mit 0, 1250, 2500 und 5000 ppt künstlich kontaminiert waren, konnte DAS durch einfache Probenextraktion mit 100 % Methanol nachgewiesen werden. Die Wiederfindungsraten waren bei Heu: 80,8 - 92,4 %; Gerste: 75,6 - 96,7 %; Weizen: 69,8 - 83,1 % und Mais: 61,0 - 91,1 %. In Hafer wurden in der Regel mehr als 93 % des zugesetzten Toxins nachgewiesen, doch wirkten sich einige Wiederfindungsraten von mehr als 100 % negativ auf die Nachweissicherheit aus.

Angesichts der geringen Kreuzreaktivität des Antiserums mit den Metaboliten Scirpentriol und 15-Monoacetoxyscirpenol, in die DAS schon kurze Zeit nach der Aufnahme mit dem Futter umgewandelt wird, wurde die Toxinausscheidung bzw. der carry-over in Milch, Serum und Harn nicht geprüft.

Summary

Development and application of an enzyme immunoassay for the detection of Diacetoxyscirpenol (DAS)

The development of an enzyme immunoassay for the detection of DAS requires first a suitable antigen. DAS was transformed via a carbodiimide method into a hemiglutarate (DAS-HG) and then coupled to the protein carrier human serum albumin (HSA). Rabbits were immunized with this DAS-HG-HSA-conjugate and after six weeks already specific antibodies could be obtained.

For the enzyme-labelling of the toxin a hemisuccinate of DAS (DAS-HS) had to be produced. The conjugation of the DAS-HS to horseradish peroxidase was performed by an active ester method.

Three ELISA-procedures were developed: a) a competitive simultaneous ELISA b) a competitive sequential saturated ELISA and c) a Double Antibody Solid Phase ELISA. The competitive simultaneous ELISA was more suitable. The detection limit for DAS in methanolic solutions was about 1 pg/ml with standard deviations usually below 4 %.

Cross reactivities with other trichothecenes were observed with 3 α -acetyl-DAS (597%), T2-toxin (5.2 %), neosolaniol (2.5 %), and 15-monoacetoxyscirpenol (1.5 %). The high cross reactivity with 3 α -acetyl-DAS is not in contrast to the antibody specificity, because this substance is more similar to DAS-HG which was used for immunization than DAS itself.

In food and feedingstuff, which were artificially contaminated with 0, 1250, 2500 and 5000 ppt of DAS, the toxin could be detected by simple extraction with 100 % methanol and subsequent ELISA. The recovery rates were as follows: hay: 80.8 - 92.4 %; barley: 75,6 - 96,7 %; wheat: 69.8 - 83.1 % and maize: 61.0 - 91.0 %.

In oats useally more than 93 % of the added toxin was found, but some recovery rates of more than 100 % resulted in a decreased detection reliability.

Because of the low cross reactivities of the antiserum with the metabolites scirpentriol and 15-monoacetoxyscirpenol, which are soonly found after ingestion of DAS, studies of the excretion of the toxin in milk, serum and urine had were not intended.

6 Literatur

- ABRAMSON, D., J.T. MILLS und B.R. BOYCOTT (1983):
Mycotoxins and mycoflora in animal feedstuffs in Western Canada
Can. J. Comp. Med. 47, 23-26
- ALLEN, N.K., R.L. JEVNE, C.J. MIROCHA und Y.W. LEE (1982):
The effect of a *Fusarium roseum* culture and diacetoxyscirpenol on
reproduction of White Leghorn females
Poultry Sci. 61, 2172-2175
- ANDERSON; G.W., J.E. ZIMMERMAN und F.M. CALLAHAN (1964):
The use of esters of N-hydroxysuccinimide in peptide synthesis
J. Amer. Chem. Soc. 86, 1839-1842
- ARAKAWA, H., M. MAEDA, A. TSUJI und A. KAMBEGAWA (1981):
Chemiluminescence enzyme immunoassay of dehydroepiandrosterone
and its sulfate using peroxidase as label
Steroids 38, 453-463
- BAUER, J. (1987):
Persönliche Mitteilung
- BAUER, J., R. WERMTER und B. GEDEK (1980):
Zur Kontamination von Futtermitteln mit toxinbildenden Fusarien-
stämmen und deren Toxinen
Wien. Tierärztl. Mschr. 67, 282-288
- BAUER, J., M. GAREIS, C. ENDERS und B. GEDEK (1985 a):
Comparative studies on the metabolism of diacetoxyscirpenol and
zearalenone in pigs
Book of abstracts, 6. Intern. IUPAC Symp. on Mycotoxins and
Phytotoxins. 22.-25.7.1985, Pretoria, SA, H2, p.43

BAUER, J., W. BOLLWAHN, M. GAREIS, B. GEDEK und K. HEINRITZI
(1985 b):

Kinetic profiles of diacetoxyscirpenol and two of its metabolites
in blood serum of pigs

Appl. Environ. Microbiol. 49, 842-845

BIERMANN, A. (1980):

Nachweis von Aflatoxin B₁ mittels Elisa

Diss. med. vet. München

BIERMANN, A. und G. TERPLAN (1980):

Nachweis von Aflatoxin B₁ mittels Elisa

Arch. Lebensmittelhyg. 31, 51-57

BOUTIBONNES, P. (1979):

Mise en evidence de l'activite antibacterienne de quelques
mycotoxines par utilisation de Bacillus thuringiensis (Berliner)

Mycopathologia 67, 45-50

BOOTH, C. (1971):

The genus Fusarium

Commonwealth Mycological Institut, Kew, Surrey, England

zitiert nach KABILKA, G. (1985)

BRIAN, P.W., A.W. DAWKINS, J.F. GROVE, H.G. HEMMING, D. LOWE und
G.L.F. NORRIS (1961):

Phytotoxic compounds produced by Fusarium equiseti

J. Exp. Bot. 12, 1-12

BULLER, R.S. (1983):

The effect of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol on the immune
system of the mouse

Ph.D., University of Montana, Michigan, p. 116-144

BURMEISTER, H.R., R.F. VESONDER und W.F. KWOLEK (1980):

Mouse bioassay for Fusarium metabolites: rejection or acceptance
when dissolved in drinking water

Appl. Environ. Microbiol. 39, 957-961

CHI, M.S. und C.J. MIROCHA (1978 a):

Necrotic oral lesions in chickens fed diacetoxyscirpenol, T-2 toxin, and crotoxin

Poultry Sci. 57, 807-808

CHI, M.S., T.S. ROBINSON, C.J. MIROCHA und K.R. REDDY (1978 b):

Acute toxicity of 12,13-epoxytrichothecenes in one-day-old broiler chicks

Appl. Environ. Microbiol. 35, 636-640

CHU, F.S (1986):

Recent studies on immunochemical analysis of mycotoxin in: STEYN, P.S. und R. VLEGGAR (Hrsg.): Mycotoxins and phytotoxins. A collection of invited papers presented at the Sixth International IUPAC symposium on mycotoxins and phytotoxins, Pretoria, Republic of South Africa, 22-25 July 1985, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

CHU, F.S., M.Y. CHEN LIANG und G.S. ZHANG (1984 a):

Production and characterization of antibody against diacetoxyscirpenol

Appl. Environ. Microbiol. 48, 777-780

CHU, F.S., S. GROSSMAN, R.-D. WEI und C.J. MIROCHA (1979):

Production of antibody against T-2 toxin

Appl. Environ. Microbiol. 37, 104-108

CHU, F.S., G.S. ZHANG, M.D. WILLIAMS, und B.B. JARVIS (1984 b):

Production and characterization of antibody against deoxyverrucarol

Appl. Environ. Microbiol. 48, 781-784

CIRILLI, G. (1983):

CIRILLI, G. (1983):

Trichothecene problems in Italy

in: UENO, Y.: Trichothecenes - chemical, biological and

in: UENO, Y.: Trichothecenes - chemical, biological and

toxicological aspects; Developments in food science 4;

toxicological aspects; Developments in food science 4;

p. 254-258

p. 254-258

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

COPPOCK, R.W. (1984):

COPPOCK, R.W. (1984):

Studies on the pharmacokinetics and toxicopathy of

Studies on the pharmacokinetics and toxicopathy of

diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol in swine, cattle and dogs

diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol in swine, cattle and dogs

Ph.D., University of Illinois, Urbana-Champaign

Ph.D., University of Illinois, Urbana-Champaign

CUNDLIFFE, E., M. CANNON und J. DAVIES (1974):

CUNDLIFFE, E., M. CANNON und J. DAVIES (1974):

Mechanism of inhibition of eucaryotic protein synthesis by

Mechanism of inhibition of eucaryotic protein synthesis by

trichothecenes fungal toxins

trichothecenes fungal toxins

Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 30-34

Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 30-34

DAWKINS, A.W. (1966):

DAWKINS, A.W. (1966):

Phytotoxic compounds produced by Fusarium equiseti. Part II. The

Phytotoxic compounds produced by Fusarium equiseti. Part II. The

chemistry of diacetoxyscirpenol

chemistry of diacetoxyscirpenol

J. Chem. Soc., 116-123

J. Chem. Soc., 116-123

DOUNIN, M. (1926):

DOUNIN, M. (1926):

The fusariosis of cereal crops in european Russia in 1923

The fusariosis of cereal crops in european Russia in 1923

Phytopathol. 16, 305-310

Phytopathol. 16, 305-310

ENGVAL, E. und P. PERLMAN (1971):

ENGVAL, E. und P. PERLMAN (1971):

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of

immunoglobulin G

immunoglobulin G

Immunochemistry, 8, 871-874

Immunochemistry, 8, 871-874

EPPLEY, R.M. (1974):

EPPLEY, R.M. (1974):

Sensitivity of brine shrimp (Artemia salina) to trichothecenes

Sensitivity of brine shrimp (Artemia salina) to trichothecenes

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 87, 618-620

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 87, 618-620

EPPLEY, R.M. (1979):

Trichothecenes and their analysis

J. Am.Oil Chem.Soc. 56, 824-829

EPPLEY, R.M. und W.J. BAILEY (1975):

12,13-epoxy- Δ^9 -trichothecenes as the probable mycotoxin responsible for stachybotryotoxicosis

Science 181, 758-760

EPPLEY, R.M., E.P. MAZZOLA, R.T. HIGHET und W.J. BAILY (1976):

Structure of satratoxin H, a metabolite of stachybotrys atra.

Application of proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance

J. Org. Chem. 42, 240-243

ERLANGER, B.F. (1980):

The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey in: VAN VANUKIS, H. und J.J. LANGONE (Hrsg.): Methods in enzymology vol. 20, p. 85-104

Academic Press, New York

ESGIN, S. (1987):

Erstellung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von T2-Toxin

Diss. med. vet. München

FAN, T.S.L., G.S. ZHANG und F.S. CHU (1984):

An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin in biological fluids

J. Food Prot. 47, 964-967

FONTELLO, P.A., J. BEHELER, D.L. BUNNER und F.S. CHU (1983):

Detection of T-2 toxin by an improved radioimmunoassay

Appl. Environ. Microbiol. 45, 640-643

FORGACS, J. und W.T. CARLL (1962):

Mycotoxicosis

in: BRANDLEY, C.A. und E.L. JUNGHERR (Hrsg.): Advances in
veterinary science, vol.7, p. 274-335

Academic Press, New York

FREEMAN, G.G. und R.J. MORRISON (1948):

Trichothecin: an antifungal metabolic product of Trichothecium
roseum Link

Nature 162, 30

GALLATI, H. und J. PRACHT (1985):

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung
der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 453-460

GAREIS, M. (1982):

Untersuchungen zum gaschromatographischen Nachweis und zur
Bildung von Trichothecenen

Diss. med. vet. München

GAREIS, M., J. BAUER und B. GEDEK (1985):

Fusarientoxine in Futtermitteln. Nachweis und Vorkommen von
Trichothecenen

Tierärztl. Prax. Suppl. 1, 8-19

GAREIS, M., A. HASHEM, J. BAUER und B. GEDEK (1986):

Identification of glucuronide metabolites of T-2 toxin and
diacetoxyscirpenol in the bile of isolated perfused rat liver

Tox. Appl. Pharm. 84, 168-172

GEDEK, B. (1972):

Biologischer Nachweis von Mykotoxinen

Zbl. Vet. Med. B, 19, 15-32

GEDEK, B. (1980):

Kompendium der medizinischen Mykologie

Paul Parey Verlag, Berlin u. Hamburg

GEDEK, B. und J. BAUER (1983):

Trichothecene problems in the Federal Republic of Germany

in: UENO, Y: Trichothecenes - chemical, biological and

toxicological aspects; Developments in food science 4,

p. 301-307

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

GENDLOFF, E.H., J.J. PESTKA, S.P. SWANSON und L.P. HART (1984):

Detection of T-2 toxin in *Fusarium sporotrichoides*-infected corn
by enzyme linked immunosorbent assay

Appl. Environ. Microbiol. 47, 1161-1163

GHOSAL, S., D.K. CHAKRABARTI und K.C.B. CHAUDHARY (1977):

The occurrence of 12,13-epoxytrichothecenes in seeds of safflower
infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *carthami*

Experientia 33, 574-575

GODTFREDSSEN, W.O., J.F. GROVE und CH. TAMM (1967):

Zur Nomenklatur einer neuen Klasse von Sesquiterpenen

Helv. Chim. Acta 50, 1666

HATZ, E. (1987):

Persönliche Mitteilung

HEBERT, G.A., P.L. PELHAM und B. PITTMAN (1973):

Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for
the fractionation of rabbit, sheep, horse, and goat antisera

Appl. Microbiol. 25, 26-36

- HOERR, F.J., W.W. CARLTON, B. YAGEN und A.Z. JOFFE (1982):
Mycotoxycosis produced in broiler chickens by multiple doses of
either T-2 toxin or diacetoxyscirpenol
Avian Pathology 11, 369-383
- HSU, J.H.-CH., E.B. SMALLEY, F.H. STRONG und W.E. RIBELIN (1972):
Identification of T-2 toxin in moldy corn associated with a
lethal toxicosis in dairy cattle
Appl. Microbiol. 24, 684
- HUNTER, K.W., A.A. BRIMFIELD, M. MILLER, F.D. FINKELMAN und F.S.
CHU (1985):
Preparation and characterization of monoclonal antibodies to the
trichothecene mycotoxin T-2
Appl. Environ. Microbiol. 49, 168-172
- KABILKA, G. (1985):
Zum Nachweis von T-2 Toxin in Blutserum, Harn und Kot
Diss. med. vet. München
- KIESSLING, K.H., H. PETTERSEN, K. SANDHOLM und M. OLSEN (1984):
Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three
trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen
bacteria
Appl. Environ. Microbiol. 47, 1070-1073
- LAFARGE-FRAYSSINET, C., G. LEPINATS, P. LAFONT, F. LOISILLIER,
S. MOUSSET, Y. ROSENSTEIN und C. FRAYSSINET (1979):
Immunosuppressive effect of Fusarium extracts and trichothecenes:
Blastogenic response of murine splenic and thymic cells to
mitogens (40439)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 160, 302-311
- LAU, H.P., P.K. GAUR und F.S. CHU (1981):
Preparation and characterization of aflatoxin B₂ α -hemiglutarate
and its use for the production of antibody against aflatoxin B₂
J. Food Safety 3, 1-13

LEE, S. und F.S. CHU (1981 a):

Radioimmunoassay of T-2 toxin in corn and wheat

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 156-161

LEE, S. und F.S. CHU (1981 b):

Radioimmunoassay of T-2 toxin in biological fluids

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 684-688

LIAO, L.L., A. GROLLMANN und S. HORWITZ (1976):

Mechanism of action of 12,13-epoxytrichothecene anguidine an inhibitor of protein synthesis

Biochem. Biophys. Acta 454, 273-284

LOEFFLER, W., R. MAULI, M.E. RUESCH und H. STÄHELIN (1965):

Anguidin and derivatives, new antibiotic and antitumoral products

ref. in: Chem. Abstr. 62, 5856 d

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR und R.J. RANDALL (1951):

Protein measurement with the folin phenol reagent

J. Biol. Chem. 193, 265-275

MÄRTLBAUER, E. (1985):

Zur Systematik und praktischen Anwendung enzymimmunologischer

Nachweise von Mykotoxinen

Vortrag anlässlich des VII. Mykotoxin-Workshops 19.-20. März 1985, München

MÄRTLBAUER, E. (1986):

Persönliche Mitteilung

MÄRTLBAUER, E. und G. Terplan (1986):

Development of enzyme immunoassays for analysis of mycotoxins
in: Proceedings of 2nd World Congress Foodborne Infections and
Intoxications, Berlin, Mai 1985, p. 920-923

MIROCHA, C.J., S.V. PATHRE, B. SCHAUERHAMMER und C.M. CHRISTENSEN (1976):

Natural occurrence of Fusarium toxins in feedstuff
Appl. Environ. Microbiol. 32, 553-556

NIESCHLAG, E., H.K. KLEY und K.-H. USADEL (1975):

Production of steroid antisera in rabbits
in: CAMERON, E.D.H., S.G. HILLIER und K. GRIFFITHS (Hrsg.):
Steroid immunoassay, proceedings of the 5th Tenovus Workshop,
Cardiff, April 1974
Alpha Omega Publ., Cardiff, p. 87-96

NOWOTNY, P., W. BALTES, W. KRÖNERT und R. WEBER (1983):

Dünnschichtchromatographische Methode zur Bestimmung von 22
Mykotoxinen in verschimmelten Lebensmitteln
Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 8, 24-28

OELLERICH, M. (1984):

Enzyme-immunoassay: a review
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 895-904

OHTA, M., H. MATSUMOTO, K. ISHII und Y. UENO (1978):

Metabolism of trichothecene mycotoxins. II. Substrate specificity
of microsomal deacetylation of trichothecenes
J. Biochem. 84, 697-706

PATHRE, S.V. und C.J. MIROCHA (1977):

Assay methods for trichothecenes and review of their natural
occurrence
in: RODRICKS, J.V., C.W. HESSELTINE und M.A. MEHLMAN (Hrsg.) :
Mycotoxins in human and animal health, p.229-253
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

PESTKA, J.J., S.C. LEE und F.S. CHU (1981):

Enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin

J. Am. Oil Chem. Soc. 58A, 940-944

PETERS, H., M.P. DIERICH und K. DOSE (1982):

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of T-2 toxin

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 1437-1441

POLZHOFFER, K. und M. NIEHUSS (1970):

Estimation of Fusarium toxins in potatoes by means of the chick embryo assay

Z. Lebensm.Unters.Forsch. 170, 124-128

PRATT, J.J. und M.G. WOLDRING (1976):

Radioimmunoassay specificity and the "first-come, first-served effect"

Clin. Chim. Acta 68, 87-90

RODRICKS, J.V. und R.M. EPPLEY (1974):

Stachybotrys and stachybotryotoxicosis

in: PURCHASE, I.F.H. (Hrsg.): Mycotoxins, p. 181-197

Elsevier Scientific Publishing Company, New York

ROMER, T.R., T.M. BOLING und J.L. MACDONALD (1978):

Gas-liquid chromatographic determination of T-2 toxin and DAS in corn and mixed feeds

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61, 801-808

ROSENSTEIN, Y., R. KRETSCHMER und C. LAFARGE-FRAYSSINET (1981):

Effect of Fusarium toxins, T-2 toxin and diacetoxyscirpenol on murine T-independent immune responses

Immunology 44, 555-560

- ROSENSTEIN, Y., C. LAFARGE-FRAYSSINET, G. LESPINATS,
F. LOISILLIER, P. LAFONT und C. FRAYSSINET (1979):
Immunosuppressive activity of Fusarium toxins. Effects on
antibody synthesis and skin grafts of crude extracts, T-2 toxin
and diacetoxyscirpenol
Immunology 36, 111-117
- ROUSH, W.R., M.A. MARLETTA, S. RUSSO-RODRIGUEZ und J. RECCHIA
(1985):
Trichothecene metabolism studies: Isolation and structure deter-
mination of 15-acetyl- 3 -(1' -D-glucopyranosiduronyl)-
scirpen-3,4 ,15-triol
J. Amer. Chem. Soc. 107, 3354-3355
- SANO, A., Y. ASABE, S. TAKITANI und Y. UENO (1982):
Fluorodensitometric determination of trichothecene mycotoxins
with nicotinamide and 2-acetylpyridine on a silica gel layer
J. Chromatogr. 235, 257-265
- SCHMIDT, R., E. ZIEGENHAGEN und K. DOSE (1981):
High-performance liquid chromatography of trichothecenes.
I. Detection of T-2 toxin and HT-2 toxin
J. Chromatogr. 212, 370-373
- SCOTT, P.M., J.W. LAWRENCE, und W. VAN WALBEEK (1970):
Detection of mycotoxins by thinlayer-chromatography: Application
of screening of fungal extracts
Appl. Microbiol. 20, 839-842
- SIEGFRIED, R. (1977):
Fusarium-Toxine
Naturwissenschaften 64, 274
- SIRIWARDANA, T.M.G. und P. LAFONT (1978):
New sensitive biological assay for 12,13-epoxytrichothecenes
Appl. Environ. Microbiol. 35, 206-207

SNYDER, A.P. (1986):

Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins

J. Food Prot. 49, 544-569

STÄHELIN, H., M.E. KALBERER-RÜSCH, E. SIGNER und S. LAZARY (1968):

Über einige biologische Wirkungen des Cytostatikum

Diacetoxyscirpenol

Arzneimi. Forsch. 18, 989-944

SZATHMARY, C.J. (1983):

Trichothecene toxicoses and natural occurrence in Hungary

in: Ueno, Y: Trichothecenes - chemical, biological and toxicological aspects; Developments in food science 4, p. 229-250

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

TAKITANI, S., Y. ASABE, T. KATO, M. SUZUKI und Y. UENO (1979):

Spectrodensitometric determination of trichothecene mycotoxins with 4-(p-nitrobenzyl)pyridine on silica gel thin layer chromatograms

J. Chromatogr. 172, 335-342

TATSUNO, T., M. SAITO, M. ENOMOTO, und H. TSUNODA (1968):

Nivalenol, a toxic principle of *Fusarium nivale*

Chem. Pharm. Bull. 16, 2519

UENO, Y. (1977):

Mode of action of trichothecenes

Pure Appl. Chem. 49, 1737-1745

UENO, Y. (1980):

Trichothecene mycotoxins - mycology, chemistry and toxicology
in: DRAPER, H.H.: Advances in nutritional research, Vol.3,
p. 301-353
Plenum Publishing Corporation, New York

UENO, Y. (1983):

General toxicology
in: UENO, Y.: Trichothecenes - chemical, biological and
toxicological aspects; Developments in food science 4, p.135-194
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

UENO, Y., M. HOSOYA und Y. ISHIKAWA (1969):

Inhibitory effects of mycotoxins on the protein synthesis in
rabbit reticulocytes
J. Biochem. 66, 419-422

UENO, Y., Y. ISHIKAWA, K. SAITO-AMAKAI und H. TSUNODA (1970 a):
Environmental factors influencing the production of fusarenon-X,
a cytotoxic mycotoxin of *Fusarium nivale* Fn 2B
Chem. Pharm. Bull. 18, 304-312

UENO, Y., N. SATO, K. ISHII, K. SAKAI und M. ENOMOTO (1972 a):
Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*.
V. Neosolaniol, T-2 toxin and butenolide, toxic metabolites of
Fusarium sporotrichoides NRRL 3510 and *Fusarium poae* 3287
Japan. J. Exp. Med. 42, 461-472

UENO, Y., M. NAKAJIMA, K. SAITO, K. ISHII, N. SATO und N. SHIMADA
(1973 a):
Comparative toxicology of trichothecene mycotoxin: inhibition of
protein synthesis in animal cells
J. Biochem. 74, 285-296

UENO, Y., N. SATO, K. ISHII, K. SOKAI, H. TSUNODA und M. ENOMOTO (1973 b):

Biological and chemical detection of trichothecene mycotoxins of *Fusarium* species

Appl. Microbiol. 25, 699-704

UENO, Y., Y. ISHIKAWA, K. AMAKAI, M. NAKAJIMA, M. SAITO, M. ENOMOTO und K. OHTSUBO (1970 b):

Comparative study on skin-necrotizing effect of scirpene metabolites of *Fusaria*

Japan. J. Exp. Med. 40, 33-38

UENO, Y., K. ISHII, K. SAKAI, S. KANAEDA, H. TSUNODA, T. TANAKA und M. ENOMOTO (1972 b):

Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*.

IV. Microbial survey on "bean-hulls poisoning" of horses with the isolation of toxic trichothecenes, neosolaniol and T-2 toxin of *Fusarium solani* M-1-1

Japan. J. Exp. Med. 42, 187-203

UENO, Y., I. UENO, K. AMAKAI, Y. ISHIKAWA, H. TSUNODA, K. OKUBO, M. SAOTO und M. ENOMOTO (1971):

II. Isolation of Fusarenon-X from culture filtrate of *Fusarium nivale* Fn 2B

Japan. J. Exp. Med. 41, 507-519

VAN WEEMEN, B.K. und A.H.W.M. SCHUURS (1971):

Immunoassay using antigen-enzyme conjugates

FEBS Letters 15, 232-236

WEAVER, G.A., H.J. KURTZ und F.Y. BATES (1981):

Diacetoxyscirpenol toxicity in pigs

Res. Vet. Sci. 31, 131-135

WEAVER, G.A., H.J. KURTZ, C.J. MIROCHA, F.Y. BATES und J.C. BEHRENS (1978):

Acute toxicity of the mycotoxin diacetoxyscirpenol in swine

Can. Vet. J. 19, 267-271

WEI, C. und L.S. MCLAUGHLIN (1974):

Structure-function relationship in the 12,13-epoxytrichothecenes,
novel inhibitors of protein synthesis

Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 838-844

WEI, R.-D., W. BISCHOFF und F.S. CHU (1986):

Production and characterization of antibody against
3'-OH-T-2 toxin

J. Food Prot. 49, 267-271

WERMTER, R. (1980):

Untersuchung des Toxinbildungsvermögens in Futtermitteln vorkom-
mender Fusarien mit physikalisch-chemischen und biologischen
Methoden

Diss. vet. med. München

WISDOM, G.B. (1976):

Review. Enzyme-immunoassay

Clin. Chem. 22, 1243-1255

WOLLENWEBER, H.W. (1932):

Die Gattung Fusarium

in: SORAUER, P.: Handbuch der Pflanzenkrankheiten, Bd. III. Die
pflanzlichen Parasiten.

Paul Parey Verlag, Berlin

zitiert nach KABILKA, G. (1985)

WORONIN, W. (1891):

Ueber das "Tausalgetreide in Süd-Ussurien".

Bot. Zeit. 49, 81-94

YALOW, R.S. und S.A. BERSON (1959):

Assay of plasma insulin in human subjects by immunological
methods

Nature 184, 1648-1649

ZHANG, G.-S., S.L. SCHUBRING und F.S. CHU (1986 a):

Improved method for production of antibodies against T-2 toxin
and diacetoxyscirpenol in rabbits

Appl. Environ. Microbiol. 51, 132-137

ZHANG, G.-S., S.W. LI und F.S. CHU (1986 b):

Production and characterization of antibody against
deoxynivalenol triacetate

J. Food Prot. 49, 336-339

Bei Herrn Professor Dr. G. Terplan möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die allzeit gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Erwin Märtlbauer danke ich besonders für die vielen Anregungen, die freundliche Hilfe und die Überlassung der Computer-Software.

Frau Gabriele Schaller danke ich für die ausgezeichnete technische Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern des Institutes, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Name: Ulrich Josef Klauffer
geb. Humbs

Geburtsdatum: 13.04.1959

Geburtsort: Regensburg

Eltern: Josef Humbs
Hannelore Humbs, geb. Willmertinger

Schulbildung: 1965-1969 Volksschule Regensburg-Keilberg
1969-1978 Werner-von-Siemens Gymnasium,
Regensburg

Wehrdienst: Juli 1978 - September 1979

Studium: WS 1979 -WS 1984 Studium der Tiermedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Staatsexamen: 29.11.1984

Approbation: 11.1.1985

Berufliche Tätigkeit: 1.1.1985 - 30.11.1987 wissenschaftliche Tätigkeit
Mitarbeiter am Lehrstuhl für Hygiene und
Technologie der Milch der Universität München

Seit 1.12.1987 Angestellter bei der Firma Dynatech
GmbH Deutschland, Denkendorf



dissertationsdruck · vervielfältigungen
f. u. t. müllerbader
Forststraße 18 · 7024 Filderstadt 4 (Plattenhardt)
Telefon (07 11) 77 15 67